

# **Herstellung von L-*tert*-Leucin mit immobilisierten Zellen und verkapselten Enzymen mit Cofaktorregenerierung**

**von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig**

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Wibke Hußmann  
aus Kiel

1. Referent: Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop  
2. Referent: apl. Professor Dr. Siegmund Lang  
eingereicht am: 13.08.2008  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 05.02.2009

Druckjahr:2009

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in den folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Tagungsbeiträge**

Hußmann, W., Vorlop, K.D. (2004) Immobilization of a formatdehydrogenase (Poster). In: Pedraz, J. L., Orive, G., Poncelet, D (eds.) *XII international workshop of bioencapsulation*, 24-26. September 2004, Vitoria (Spanien), ISBN 84-8373-649-7, 222-225.



# INHALTSVERZEICHNIS

|          |   |          |
|----------|---|----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung und Aufgabenstellung</b>  | <b>1</b> |
| 1.1      | Einleitung  | 1        |
| 1.2      | Aufgabenstellung  | 2        |
| <b>2</b> | <b>Theoretische Grundlagen</b>  | <b>5</b> |
| 2.1      | Biokatalysatoren in der Produktion von Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen                                     | 5        |
| 2.2      | Bedeutung von nicht-proteinogenen Aminosäuren wie L- <i>tert</i> -Leucin  | 7        |
| 2.3      | Cofaktorregenerierung   | 9        |
| 2.3.1    | Bedeutung der Cofaktorregenerierung bei der cofaktorabhängigen Herstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren und Alkoholen | 12       |
| 2.3.2    | Elektrochemische Cofaktorregenerierung  | 12       |
| 2.3.3    | Chemische und photochemische Cofaktorregenerierung  | 14       |
| 2.3.4    | Enzymatische Cofaktorregenerierung  | 15       |
| 2.3.5    | Cofaktorregenerierung mit ganzen Zellen   | 18       |
| 2.4      | Formiatdehydrogenase (FDH) aus <i>Candida boidinii</i> und Leucindehydrogenase (LeuDH) aus <i>Bacillus cereus</i>           | 20       |
| 2.5      | Immobilisierung von Enzymen   | 27       |
| 2.5.1    | Immobilisierung durch Anbindung   | 30       |
| 2.5.1.1  | Fixierung an einen festen Träger  | 30       |
| 2.5.1.2  | Quervernetzung  | 31       |
| 2.5.2    | Immobilisierung durch Einschluß   | 32       |
| 2.5.2.1  | Membranabtrennung   | 32       |
| 2.5.2.2  | Matrixeinhüllung  | 34       |
| 2.5.2.3  | Verkapselung in Polyelektrolythohlkugeln  | 34       |
| 2.6      | Immobilisierung von Zellen  | 41       |
| 2.6.1    | Immobilisierungsmethoden von Zellen   | 42       |
| 2.6.1.1  | Ausflockung   | 42       |
| 2.6.1.2  | Adsorption/Adhäsion   | 42       |
| 2.6.1.3  | Einschluss von Zellen   | 42       |
| 2.6.1.4  | Geleinschluß in Calciumalginat  | 44       |
| 2.6.1.5  | Geleinschluß in $\kappa$ -Carrageenan   | 47       |
| 2.7      | Beispiele der Immobilisierung von FDH und LeuDH   | 50       |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>3</b>   | <b>Experimenteller Teil</b>   | <b>52</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Analytik</b>   | <b>52</b> |
| 3.1.1      | Bestimmung der Enzymaktivitäten   | 52        |
| 3.1.1.1    | Formiatdehydrogenase  | 52        |
| 3.1.1.2    | Leucindehydrogenase   | 52        |
| 3.1.1.3    | Messung der Enzymaktivität der freien Enzyme  | 53        |
| 3.1.1.4    | Messung der Enzymaktivität von mit Glutaraldehyd und Chitosan quervernetzter Formiatdehydrogenase und ausgeflocktem Enzym | 53        |
| 3.1.1.5    | Messung der Enzymaktivität von verkapseltem und von ausgeflocktem Enzym   | 54        |
| 3.1.1.6    | Messung der Aktivität der parallelverkapselten Enzyme LeuDH und FDH   | 55        |
| 3.1.2      | HPLC-Analytik   | 56        |
| 3.1.3      | GC-Analytik zur Bestimmung der L- <i>tert</i> -Leucin-Konzentration   | 57        |
| 3.1.4      | Bestimmung der Proteinkonzentration   | 59        |
| <b>3.2</b> | <b>Immobilisierungsmethoden</b>   | <b>59</b> |
| 3.2.1      | Herstellung von Polyelektrolythohlkugeln  | 59        |
| 3.2.2      | Vernetzung der FDH mit Glutaraldehyd und Chitosan   | 61        |
| 3.2.3      | Vernetzung der FDH mit voraktivierten Chitosanflocken   | 62        |
| 3.2.4      | Ausflockung der FDH mit unterschiedlichen Flockungsmitteln  | 63        |
| 3.2.4.1    | Ausflockung der FDH mit kationischen Flockungsmitteln   | 63        |
| 3.2.4.2    | Ausflockung der FDH mit kationischen und anionischen Flockungsmitteln   | 64        |
| 3.2.5      | Verkapselung von ganzen Zellen  | 65        |
| 3.2.5.1    | Verkapselung in Alginatkugeln   | 65        |
| 3.2.5.2    | Verkapselung in Carragenankugeln  | 66        |
| 3.2.6      | Einschluß von ganzen Zellen in PVAL-Linsen  | 68        |
| <b>3.3</b> | <b>Ganzzellkatalysatoren</b>  | <b>69</b> |
| 3.3.1      | Verwendete Zellen   | 69        |
| 3.3.2      | Verwendete Medien zur Zellanzucht und Permeabilisierung   | 70        |
| 3.3.3      | Stammhaltung  | 71        |
| 3.3.4      | Anzucht der Vorkultur   | 71        |
| 3.3.5      | Anzucht der Hauptkultur   | 71        |
| 3.3.6      | Permeabilisierung der Zellwand  | 72        |
| 3.3.7      | Messung der Zellaktivität   | 73        |
| 3.3.7.1    | Messung der Zellaktivität bei freien Zellen   | 75        |
| 3.3.7.2    | Messung der Zellaktivität bei immobilisierten Zellen  | 75        |
| 3.3.8      | Mehrfacheinsatz von Immobilisaten   | 76        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>4</b>   | <b>Ergebnisse und Diskussion:<br/>Immobilisierung der FDH und der LeuDh als isolierte Enzyme</b> | <b>77</b>  |
| <b>4.1</b> | <b>Vorversuche zur FDH und zur LeuDh</b>   | <b>77</b>  |
| 4.1.1      | FDH  | 77         |
| 4.1.1.1    | PH-Wert Stabilität   | 77         |
| 4.1.1.2    | Stabilität der FDH in der Reaktionslösung bei 30 °C  | 78         |
| 4.1.2      | LeuDh  | 79         |
| <b>4.2</b> | <b>Immobilisierung der FDH</b>   | <b>80</b>  |
| 4.2.1      | Coquervernetzung der FDH mit Glutardialdehyd und Chitosan  | 80         |
| 4.2.1.1    | Direkte Coquervernetzung der FDH mit Glutardialdehyd und Chitosan                                | 80         |
| 4.2.1.2    | Bindung der FDH an mit Glutardialdehyd aktivierte Chitosanflocken                                | 83         |
| 4.2.2      | Ausflockung der FDH mit Polyelektrolyten   | 86         |
| 4.2.3      | Verkapselung der FDH in Polyelektrolythohlkugeln   | 89         |
| 4.2.3.1    | Langzeitaktivität der FDH in den Polyelektrolytlösungen Cellulosesulfat und PDADMAC              | 90         |
| 4.2.3.2    | Herstellung von Polyelektrolythohlkugeln mit FDH   | 91         |
| 4.2.3.3    | Untersuchung zum Enzymverlust während des Mehrfacheinsatzes                                      | 92         |
| 4.2.3.4    | Untersuchungen an mit FDH beladenen Hohlkugeln   | 93         |
| 4.2.3.5    | Unterschiedliche NAD-Konzentrationen   | 97         |
| 4.2.3.6    | Untersuchung verschiedener Parameter zur Kapselbildung   | 99         |
| <b>4.3</b> | <b>Immobilisierung der LeuDh</b>   | <b>100</b> |
| 4.3.1      | Langzeitaktivität der freien LeuDh in CS   | 100        |
| 4.3.2      | Verkapselung der LeuDh in Polyelektrolythohlkugeln   | 101        |
| <b>4.4</b> | <b>Gemeinsame Immobilisierung der FDH und der LeuDh</b>  | <b>102</b> |
| 4.4.1      | Verkapselung beider Enzyme in CS/PDADMAC Kugeln  | 102        |
| 4.4.2      | Optimierung der Polyelektrolytkugeln   | 104        |
| <b>5</b>   | <b>Ergebnisse und Diskussion:<br/>Immobilisierung von ganzen Zellen</b>                          | <b>110</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Einschluss der Zellen in PVAL-Linsen</b>  | <b>111</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Einschluss der Zellen in Calcium-Alginat-Kugeln</b>   | <b>112</b> |
| 5.2.1      | Vergleich der Aktivität von freien Zellen mit immobilisierten Zellen                             | 112        |
| 5.2.2      | Mehrfacheinsatz der Alginatkugeln  | 113        |
| 5.2.3      | Einfluß der Substratkonzentration auf die Zellaktivität  | 115        |
| <b>5.3</b> | <b>Einschluss der Zellen in Carrageenan-Kugeln</b>   | <b>118</b> |
| 5.3.1      | Mehrfacheinsatz von 2% igen Carrageenan-Kugeln   | 119        |
| 5.3.2      | Mehrfacheinsatz von 3% igen Carrageenan-Kugeln   | 120        |
| 5.3.3      | Mehrfacheinsatz von 3% igen Carrageenan-Kugeln mit 0,2 mM NAD und 450 mM TMP                     | 122        |
| 5.3.4      | Einfluß der Substratkonzentrationen auf die Zellaktivität  | 125        |
| <b>5.4</b> | <b>Untersuchung zum unvollständigen TMP-Umsatz bei 450 mM TMP und 0,2 mM NAD</b>                 | <b>129</b> |
| 5.4.1      | Analyse der NAD-Konzentration während des Umsatzes   | 129        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 5.4.1.1   | Aufbau einer Methode zur Bestimmung des von den Enzymen verwertbaren Cofaktors | 129        |
| 5.4.1.2   | Analyse der Cofaktor- Konzentration während des Umsatzes                       | 133        |
| 5.4.2     | Untersuchungen zur Inaktivierung des Cofaktors                                 | 134        |
| <b>6</b>  | <b>Zusammenfassung und Ausblick</b>  | <b>138</b> |
| 6.1       | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>138</b> |
| 6.1.1     | Immobilisierung isolierter Enzyme  | 138        |
| 6.1.2     | Immobilisierung der Enzymen innerhalb von ganzen Zellen                        | 139        |
| 6.2       | <b>Ausblick</b>  | <b>140</b> |
| <b>7</b>  | <b>Literatur</b>   | <b>141</b> |
| <b>8</b>  | <b>Abkürzungen</b>   | <b>154</b> |
| 8.1       | Abkürzungen  | 154        |
| 8.2       | Formelzeichen und Symbole  | 156        |
| <b>9</b>  | <b>Verwendete Geräte und Chemikalien</b>                                       | <b>158</b> |
| 9.1       | Verwendete Geräte  | 158        |
| 9.2       | Verwendete Chemikalien   | 159        |
| <b>10</b> | <b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>                                     | <b>161</b> |
| 10.1      | Abbildungsverzeichnis  | 161        |
| 10.2      | Tabellenverzeichnis  | 163        |
|           | <b>Danksagung</b>  | <b>165</b> |
|           | <b>Lebenslauf</b>  | <b>166</b> |



# 1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

## 1.1 Einleitung

Die Verwendung von Biokatalysatoren in Form von Enzymen oder ganzen Zellen spielt in der industriellen Produktion von Feinchemikalien eine zunehmend größere Rolle. Die Vorteile von Biokatalysatoren gegenüber chemischen Katalysatoren sind vor allem die milden Reaktionsbedingungen und die Möglichkeit der Verwendung nachwachsender Rohstoffe, was die Biokatalyse zu einem umweltfreundlicheren und nachhaltigeren Herstellungsverfahren macht. Die hohe Substrat-, Regio-, und vor allem Stereospezifität sind weitere charakteristische Besonderheiten von Biokatalysatoren. Dies ist besonders bei der Produktion enantiomerenreiner Verbindungen wie pharmazeutischer Wirkstoffe, Vitaminen, Geschmacksstoffen oder auch enantiomerenreinen Aminosäuren und sekundären Alkoholen von Vorteil. Enzyme können im Bereich der biokatalytischen Verfahren am vielfältigsten eingesetzt werden. Am sinnvollsten ist dabei der Einsatz von Enzymen mit einem großen Substratspektrum und einer hohen Stereoselektivität [77,104].

Enantiomerenreine Aminosäuren und sekundäre Alkohole haben eine sehr große Bedeutung als Vor- und Zwischenstufen bei der Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe. Gerade dort wird eine sehr hohe Enantiomerenreinheit gefordert [100]. Die biokatalytische Herstellung kann über Enzyme wie Dehydrogenasen erfolgen, welche die entsprechende Ketosäure oder das entsprechende Keton zur Aminosäure oder Alkohohl umwandelt. Damit können auch enantiomerenreine, nicht-proteinogene Aminosäuren hergestellt werden, die über herkömmliche Wege wie Proteinhydrolyse oder Fermentation nicht verfügbar sind, aber eine wichtige Rolle in der pharmazeutischen Industrie spielen [78]. Dasselbe gilt auch für einige chirale Alkohole [100].

Dehydrogenasen benötigen für ihre Reaktion teure Cofaktoren, die während der Reaktion verbraucht werden und die, um den Prozess wirtschaftlich zu gestalten, in einem weiteren Prozess-Schritt regeneriert werden müssen (=> Cofaktorregenerierung). Die am häufigsten verwendete Methode ist hierbei die enzymatische Cofaktorregenerierung. Dieses Verfahren, enantiomerenreine Aminosäuren mit Dehydrogenasen und enzymatischer Cofaktorregenerierung herzustellen, wird im industriellen Maßstab von der Degussa AG bereits seit Mitte der 80er Jahre angewendet. Dort wird z.B. L-*tert*-Leucin mit Hilfe einer Leucindehydrogenase und einer Formiatdehydrogenase zur Cofaktorregenerierung im Tonnenmaßstab produziert.

Alternativ zur Verwendung von isolierten Enzymen können auch genetisch veränderte Mikroorganismen zur biotechnologischen L-*tert*-Leucin-Herstellung genutzt werden, welche diese beiden Enzyme direkt exprimieren können. Durch die Verwendung dieser Ganzzellkatalysatoren bzw. so genannter „Designerzellen“ [100] können die Enzymkosten und damit die Prozesskosten stark gesenkt werden. Auch diese Alternative wurde von der Degussa AG 2005 erfolgreich in den industriellen Maßstab übertragen [100].

Eine weitere Verbesserung enzymkatalytischer Prozesse kann durch eine Immobilisierung der Enzyme und der Designerzellen erreicht werden. Durch eine Immobilisierung, d.h. durch eine feste Bindung an oder in einen makroskopischen Träger, können die Biokatalysatoren mehrfach wiedereingesetzt werden, was die Katalysatorkosten gerade bei teuren Enzymen (Formiatdehydrogenase) senkt. Auch wird durch eine Immobilisierung häufig eine höhere Stabilität der Biokatalysatoren erreicht. Weitere Vorteile sind zudem eine vereinfachte Produktaufreinigung, da die möglichst leicht handhabbaren Immobilisate gut von dem Medium abgetrennt werden können sowie die Möglichkeit einer kontinuierlichen Prozessführung und der Nutzung eines Zweiphasensystems besteht. Nachteilig kann sich allerdings ein Aktivitätsverlust des immobilisierten Biokatalysators auswirken.

In dieser Arbeit soll das cofakorregenerierende System Formiatdehydrogenase/Leucindehydrogenase einerseits als isolierte Enzyme sowie außerdem als Ganzzellkatalysatoren in kostengünstige, stabile und leicht-handhabbare Immobilisate immobilisiert werden.

## **1.2 Aufgabenstellung**

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Kooperationsprojektes „Entwicklung eines biokatalytischen und nachhaltigen Verfahrens zur industriellen Herstellung enantiomerenreiner Amine und Alkohole unter besonderer Berücksichtigung der Atomökonomie“ angefertigt. Das Kooperationsprojekt dient der Optimierung bzw. Verbesserung des biokatalytischen Herstellungsprozesses von enantiomerenreinen Aminosäuren und Alkoholen mit Hilfe von Dehydrogenasen und anschließender Regenerierung des verbrauchten Cofaktors durch ein zweites Enzym. Während die Aufgaben der anderen Projektpartner das genetische und klassische Screening sowie das Hochdurchsatzscreening nach neuen Dehydrogenasen (Firma Brain, Zwingenberg; Forschungszentrum Jülich, Institut für Enzymtechnologie; Degussa AG, Projekthaus Biotechnologie, Hanau), die Herstellung von Ganzzellkatalysatoren/Designerzellen (Universität Stuttgart, Institut für industrielle Genetik) und die Umsetzung in den Pilotmaßstab sowie das Prozeßdesign (Degussa AG, Projekthaus Biotechnologie, Hanau) waren, bestand die Aufgabe dieser Arbeit in der Immobilisierung von Enzymen und Ganzzellkatalysatoren.

Es sollten zunächst die beiden isolierten Enzyme Leucindehydrogenase und Formiatdehydrogenase zur Produktion der nicht-proteinogenen enantiomerenreinen Aminosäure L-*tert*-Leucin immobilisiert werden. Während die Leucindehydrogenase für die Synthese des L-*tert*-Leucin aus der Ketosäure Trimethylpyruvat zuständig ist, wird von der Formiatdehydrogenase der verbrauchte Cofaktor NAD in NADH zurückgewandelt bzw. regeneriert (siehe Abbildung 1-1).

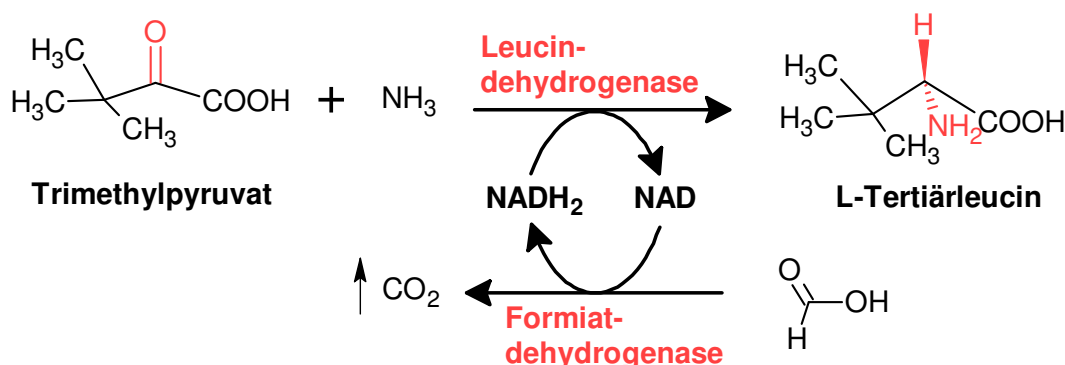


Abbildung 1-1: Cofaktorregenerierung mit FDH und LeuDh zur Produktion von L-*tert*-Leucin

Da die Formiatdehydrogenase das instabilere und empfindlichere Enzym ist, sollte hierfür zunächst eine geeignete Immobilisierungsmethode gefunden werden. Nach erfolgreicher Immobilisierung sollten die Formiatdehydrogenase zusammen mit der Leucindehydrogenase parallel immobilisiert werden. Die entstandenen Immobilisate waren dann entsprechend zu optimieren und im Mehrfacheinsatz zu testen.

Anschließend sollte für einen Ganzzellkatalysator (Designerzelle), in den die Gene beider Enzyme hineinkloniert wurden, ebenfalls eine geeignete Immobilisierungsmethode entwickelt, optimiert und im Mehrfacheinsatz getestet werden.

Die Immobilisate sollten dabei möglichst viele der folgenden Kriterien erfüllen:

- geringe Inaktivierung des Biokatalysators während des Immobilisierungsprozesses
- geringe Immobilisierungskosten und einfache Immobilisierungstechniken
- gute Langzeitstabilität des Biokatalysators, d.h. geringe Inaktivierung und geringes Leaching des Biokatalysators aus dem Immobilisat während eines Mehrfacheinsatzes
- gute Stabilität des Immobilisates während des Prozesses
- leichte Handhabbarkeit und gute Abtrennung des Immobilisates
- geringe Diffusionsprobleme
- möglichst geringe Menge an benötigtem Cofaktor

Im Erfolgsfall sollten die für L-*tert*-Leucin entwickelten und optimierten Immobilisierungsmethoden auch auf andere cofaktorregenerierende Systeme anwendbar sein.

## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 *Biokatalysatoren in der Produktion von Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen*

Biokatalysatoren sind aus biologischen Systemen stammende Katalysatoren (Enzyme bzw. Zellen mit den entsprechenden Enzymen), die bestimmte Stoffumwandlungen von Substraten zu Wertstoffen katalysieren. Die Biokatalyse im klassischen Sinn hat vor allem in der Lebensmittelproduktion eine lange Tradition. So sind z.B. das Bierbrauen, das Keltern von Wein, das Brotbacken mit Hefe- oder Sauerteig, die Essigsäure- oder auch die Käseherstellung klassische und sehr alte Verfahren in der Biokatalyse. Diese Verfahren wurden ursprünglich ohne Kenntnis über die Wirkung von Enzymen angewendet.

Die moderne Biokatalyse mit dem gezielten Einsatz von Biokatalysatoren ist noch relativ jung und konkurriert häufig mit der chemischen Katalyse. Allerdings stellt sie gerade in der Produktion von Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen eine gute Alternative zur rein chemischen Herstellung dar. Viele Produkte sind nur auf biokatalytischem Wege herstellbar. Die Vorteile von Biokatalysen im Vergleich zu chemischen Katalysatoren sind:

1. **Hohe Substrat-, Regio- und Stereospezifität, vor allem bei dem Einsatz von isolierten Enzymen:** Durch die hohe Substrat- und Regiospezifität von Biokatalysatoren werden die Substrate ohne viele Nebenreaktionen und ohne die Entstehung von unerwünschten Nebenprodukten umgesetzt. Dies erleichtert die Aufreinigung der Produkte und erhöht die Produktausbeute. Weiterhin sind eventuell entstandene Nebenprodukte biologisch abbaubar. Die Stereospezifität ist einer der größten Vorteile der Biokatalyse. Dadurch können chirale Produkte in einer sehr hohen Enantiomerenreinheit hergestellt werden, ohne dass das andere Enantiomer entsteht. Dies ist bei der chemischen Herstellung nur mit großem Aufwand möglich. Die Enantiomerenreinheit ist gerade bei Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen von sehr großer Bedeutung, da die biologische Wirkung vieler Stoffe stereospezifisch ist. Das andere Enantiomer derselben Verbindung z. B. bei Medikamenten, kann eine toxische Wirkung haben.
2. **Milde Reaktionsbedingungen / weniger (vor allem weniger toxische) Abfallprodukte:** Enzymatische Reaktionen verlaufen bei niedrigen Temperaturen (meistens zwischen 20-40 °C). Die Enzyme arbeiten zumeist im wässrigen Milieu und benötigen keinen hohen Druck. Bei chemischen Reaktionen werden dagegen oft hohe Temperaturen und Drücke verwendet, was hohe Energie- und Investitionskosten verursacht. Darüber hinaus kommen oft verschiedene Lösemittel

und toxische Reagenzien zum Einsatz. Toxische Nebenprodukte fallen bei chemischen Produktionsverfahren häufiger an. Sie führen zu einem stark erhöhten Entsorgungsaufwand, erschweren die Produktaufreinigung und verursachen Probleme bzgl. der Anlagensicherheit. Das macht die Biokatalyse zu einem umweltfreundlicheren und nachhaltigeren Herstellungsweg.

- 3. Vielseitigkeit der Biokatalysatoren:** Häufig können Biokatalysatoren unterschiedliche Substrate selektiv in die gewünschten Produkte umwandeln. Dies erhöht die flexible Einsatzfähigkeit von Biokatalysatoren [159].
- 4. Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen:** Viele biokatalytischen Prozesse, vor allem Fermentationen mit lebenden Zellen, können als Substrate Verbindungen aus nachwachsenden Rohstoffen nutzen. Obwohl auch die chemische Industrie viele ihrer Verfahren auf diese Rohstoffbasis umstellt, hat die Biokatalyse bisher noch die besseren Möglichkeiten in diesem Bereich. Gerade bezüglich der Nachhaltigkeit wird dieser Aspekt immer wichtiger [159].
- 5. Weniger Schritte zur Herstellung von komplexen Verbindungen:** Gerade die in der Pharmazie häufig benötigten komplexen Verbindungen können chemisch nur sehr aufwendig durch viele Reaktionsschritte hergestellt werden. Enzymatische Verfahren benötigen zur Synthese derselben Stoffe meist weniger Reaktionsstufen. Ein Beispiel hierfür ist die Herstellung von 6-Aminopenicillansäure, einer Vorstufe des Antibiotikum Ampicillin, aus Penicillin G. Während in der enzymatischen Synthese dazu nur ein einziger Schritt nötig ist, wird das Produkt im chemischen Herstellungsprozess über viele Stufen hergestellt [16].

Nachteilig sind die häufig hohen Kosten der biokatalytischen Prozesse. Diese werden vor allem durch die Verwendung teurer Enzyme und teurer Substrate verursacht. Hinzu kommen vergleichsweise geringe Endproduktkonzentrationen, die den Aufreinigungsaufwand vergrößern sowie häufig geringe Produktivitäten. Einige Enzyme, beispielsweise Dehydrogenasen zur Herstellung von Alkoholen und Aminen, benötigen für ihre Funktion Cofaktoren (siehe Kapitel 2.3), was ebenfalls die Kosten erhöht. Auch die Instabilität der Biokatalysatoren gegenüber hohen Temperaturen, bestimmten Chemikalien (z.B. organischen Lösemittel) und Metallen sowie durch biologische Degradation ist ein Nachteil.

Neben den mengenmäßig größten, meist fermentativ hergestellten Produkten wie Lebensmittel, Lösemittel und Kraftstoffe wie Bioethanol, Säuren, Lipiden und Polymeren [34] ist die Biokatalyse, auch in Form der Biotransformation, eine wichtige Methode zur Herstellung von pharmazeutischen Wirkstoffen und Feinchemikalien [159] wie Antibiotika, enantiomerenreinen Aminen (bzw. Aminosäuren) oder Alkoholen, Vitaminen und Hormonen

bzw. Steroiden als Hormonvorstufen. Dies sind dabei einerseits häufig komplexe Verbindungen, für die in der rein chemischen Synthese viele Schritte benötigt werden oder enantiomerenreine Stoffe, die wegen der Stereoselektivität von Biokatalysatoren besser hergestellt werden können. Andererseits sind Feinchemikalien und pharmazeutische Wirkstoffe eher hochpreisige Produkte, die in den im Vergleich zur chemischen Industrie kleinvolumigeren und kostenintensiveren Prozessen biokatalytischen Prozessen gut hergestellt werden können [159]. Oftmals werden chemische und biokatalytische Prozesse kombiniert, wie z.B. in der Produktion von D-Ephedrin, Cortison, 6-Aminopenicillinsäure (s. o.), 5-Cyanovaleriansäureamid (Vorstufe für ein Herbizid) und vielen anderen [142;144;159;174].

Neuere Entwicklungen befassen sich mit einigen Problemen, die sich bisher nachteilig auf die Anwendung biokatalytischer Prozesse ausgewirkt haben. So wurden für Enzyme, welche für ihre Reaktion Cofaktoren benötigen, erfolgreich Prozesse mit Cofaktorregenerierung entwickelt [142]. Dies ist vor allem für die Anwendung von Dehydrogenasen beschrieben (siehe Kapitel 2.3). Die Kosten für die Verwendung von teuren Enzymen können durch die Immobilisierung dieser Enzyme (siehe Kapitel 2.5) oder auch durch die Verwendung von ruhenden Ganzzellkatalysatoren, die die entsprechenden Enzyme exprimieren können (siehe Kapitel 2.3.5) [142] gesenkt werden. Auch für den Nachteil einiger biokatalytischer Prozesse, bei denen die Edukte (wie z.B. Ketone) schwer wasserlöslich sind und die entsprechenden Biokatalysatoren jedoch instabil in organischen Lösemitteln sind, wurden einige erfolgreiche Lösungen beschrieben [142]. So konnten z.B. 2-Phasensysteme entwickelt werden, bei denen die verwendeten, gegenüber organischen Lösemitteln empfindlichen Enzyme eine gute Stabilität aufwiesen [47;48]. In anderen Entwicklungen konnte die Aktivität der Enzyme in den organischen Medien durch bestimmte Salzzusätze erhöht werden [142].

Insgesamt nimmt der Einfluß biokatalytischer Prozesse in der Synthese von Wirkstoffen und Feinchemikalien immer stärker zu, so dass auch früher rein chemisch produzierende Unternehmen wie die BASF verstärkt Aktivitäten auf diesem Gebiet zeigen.

## **2.2 Bedeutung von nicht-proteinogenen Aminosäuren wie L-tert-Leucin**

Nicht-proteinogenen Aminosäuren, wie z.B. D-Aminosäuren, werden nicht wie proteinogene Aminosäuren natürlicherweise als Bausteine in Proteinen verwandt. Sie kommen als Intermediate, Bestandteile von Hormonen, Antibiotika und anderen Sekundärmetaboliten und Naturstoffen sowie in Zellwänden vor. Als Ausgangsmaterial für die Synthese von medizinischen Wirkstoffen in der Pharmazie und als Intermediate für Lebensmittelzusätze und Agrochemikalien haben sie eine große Bedeutung. Sie werden bei vielen medizinischen

Wirkstoffen eingebaut, was unter anderem den Vorteil hat, dass die Medikamente nicht so schnell von Proteasen abgebaut werden, da diese häufig auf die proteinogenen Aminosäuren spezialisiert sind [12;70;102].

L-*tert*-Leucin (2-Amino-3,3-dimethyl-butansäure, s. Abbildung 2-6) kommt natürlicherweise in einigen antimikrobiell wirkenden Substanzen mariner Schwämme [41] sowie in dem Peptidantibiotikum Bottromycin A des Bodenbakteriums *Streptomyces bottropensis* [140] vor. Die Besonderheit in der industriellen Anwendung von L-*tert*-Leucin liegt in der tertiären Butylgruppe als Seitenkette und in der Eigenschaft als nicht-proteinogene Aminosäure [12].

L-*tert*-Leucin wird einerseits in der asymmetrischen Synthese angewendet, bei der der Einbau von L-*tert*-Leucin als chirales Auxiliar in den Katalysator anstelle von Aminosäuren wie Valin eine hohe enantiomeren- und diastereomeren Reinheit der Produkte hervorruft [12]. Weiterhin wird L-*tert*-Leucin in der Medizin als Bestandteil zahlreicher potenzieller pharmakologischer Peptid-Wirkstoffe wie Antitumoreagenzien in der Chemotherapie, antivirale Medikamente in der Bekämpfung von dem Herpes simplex Virus und Wirkstoffe gegen Arthritis [12] verwendet. Dort kann es die natürlichen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin ersetzen, was häufig die Hydrophobizität des Wirkstoffes erhöht und den Wirkstoff, wie auch oben erwähnt, stabiler gegen enzymatischen Abbau macht [12]. Beispiele für einen aktuellen, wichtigen pharmazeutischen Wirkstoff sind die von den Firmen Bristol-Myers Squibb, Sandoz und Abbott entwickelten HIV-Protease-Inhibitoren (siehe Abbildung 2-1), welche sich teilweise noch in der klinischen und präklinischen Erprobungsphase befinden [12;76].

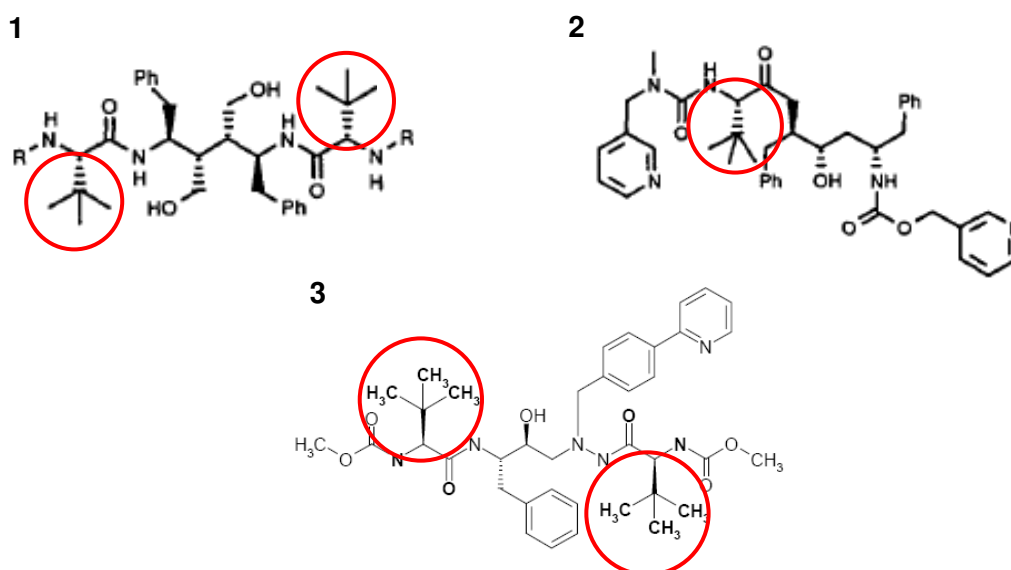


Abbildung 2-1: HIV-Protease-Inhibitor der Firmen Sandoz (1), Abbott (2) und Bristol-Myers Squibb (3) (aus [12;76]). L-*tert*-Leucin ist mit einem roten Kreis markiert



### 2.3 Cofaktorregenerierung

Viele Enzyme wie Oxidoreduktasen, Ligasen, Isomerasen oder Kinasen benötigen für ihre Reaktion den Zusatz von Cofaktoren (über ein Drittel der bei der internationalen Union für Biochemie registrierten Enzyme benötigen einen der Cofaktoren NAD, NADP, ATP, FAD oder CoA). Dies sind niedermolekulare Substanzen, die in die Katalyse als Reaktionspartner eingreifen, dabei verändert und erst nach der Beendigung der Reaktion wieder in ihren Ursprungszustand zurückversetzt werden.

Tabelle 2-1 Häufig in der Natur vorkommende Coenzyme und prostetischen Gruppen (aus [123])

| Coenzym bzw. prosthetische Gruppe          | Häufig gebrauchte Abkürzung | Übertragene Gruppe                  |
|--|-----------------------------|-------------------------------------|
| <b>I. Wasserstoffübertragende Coenzyme</b> |                             |                                     |
| Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid             | NAD                         | Wasserstoff                         |
| Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat    | NADP                        | Wasserstoff                         |
| Flavinmononucleotid                        | FMN                         | Wasserstoff                         |
| Flavin-Adenin-Dinucleotid                  | FAD                         | Wasserstoff                         |
| Ubichinon                                  | Q                           | Wasserstoff                         |
| Zellhämone                                 |                             | Elektronen                          |
| Liponsäure                                 | Lip(S <sub>2</sub> )        | Wasserstoff und Acyl-Gruppen        |
| <b>II. Gruppenübertragende Coenzyme</b>    |                             |                                     |
| Adenosintriphosphat                        | ATP                         | Phosphorsäure-Rest (und AMP-Rest)   |
| Phospho-adenosin-phospho-sulfat            | PAPS                        | Schwefelsäure-Rest                  |
| Pyridoxalphosphat                          | PLP                         | Amino-Gruppe                        |
| Cytidindiphosphat                          | CDP                         | Phosphocholin und verwandte Gruppen |
| Uridindiphosphat                           | UDP                         | Zucker, Uronsäure                   |
| <b>Coenzyme für C1-Transfer</b>            |                             |                                     |
| Adenosylmethionin                          | SAM                         | Methyl-Gruppe                       |
| Tetrahydrofolsäure                         | H <sub>4</sub> -folat       | Formyl-Gruppe                       |
| Biotin                                     |                             | Carboxy-Gruppen (CO <sub>2</sub> )  |
| <b>Coenzyme für C2-Transfer</b>            |                             |                                     |
| Coenzym A                                  | CoA                         | Acetyl (Acyl)                       |

| Coenzym bzw. prosthetische Gruppe                 | Häufig gebrauchte Abkürzung | Übertragene Gruppe              |
|---|-----------------------------|---------------------------------|
| Thiamindiphosphat                                 | ThPP                        | C <sub>2</sub> -Aldehyd-Gruppen |
| <b>III. Wirkgruppen der Isomerasen und Lyasen</b> |                             |                                 |
| Uridindiphosphat                                  | UDP                         | Zuckerisomerisierung            |
| Pyridoxalphosphat                                 | PLP                         | Decarboxylierung                |
| Thiamindiphosphat                                 | ThPP                        | Decarboxylierung                |
| B <sub>12</sub> -Gruppen                          | B <sub>12</sub>             | Umlagerung                      |

Dieses Regenerieren erfolgt meist durch eine weitere Reaktion eines anderen Enzyms. Cofaktoren existieren als anorganische Cofaktoren (z.B. Metalle), als eine mit dem Enzym festverbundene organische Form, die prosthetische Gruppe, oder als frei bewegliche Cofaktoren, das Coenzym. Eine Übersicht über die häufigsten in der Natur vorkommenden Coenzyme und prostetischen Gruppen ist in Tabelle 2-1 gegeben.

Im Folgenden wird näher auf die freibewegliche Form der Cofaktoren eingegangen, wie z.B. zur Übertragung von Wasserstoff bei der Oxidation oder Reduktion von Substraten oder Molekülgruppen bei anderen Substratumwandlungen. Die wichtigsten freibeweglichen Cofaktoren sind dabei AMP/ADP/ATP zur Übertragung von Phosphorresten sowie NAD/NADH und NADP/NADPH als Wasserstoffüberträger [169]. Während AMP/ADP/ATP und die zugehörigen Enzyme in der Industrie kaum Anwendung finden, ist die Verwendung von NAD/NADH und NADP/NADPH für industrielle Prozesse mit Oxidoreduktasen sehr häufig. Deshalb wird nachfolgend vor allem auf Reaktionen mit diesen wasserstoffübertragenden Coenzymen eingegangen.

Tabelle 2-2: Coenzymkosten 2003 [169]

| Cofactor | Preis [€/mol], Jülich Fine Chemicals (2003) |
|----------|---|
| NAD      | 2655  |
| NADH     | 8868  |
| NADP     | 11417                                       |
| NADPH    | 167846                                      |

Wie in Tabelle 2-2 ersichtlich ist, sind wasserstoffübertragende Cofaktoren verhältnismäßig teuer. Daher sind industrielle Verfahren bei einem stöchiometrischem Einsatz solcher Cofaktoren ökonomisch unrentabel. Eine Methode, diese Verfahren wirtschaftlicher zu gestalten, ist die Cofaktorregenerierung. Dabei wird der durch die Synthese des gewünschten Produktes umgewandelte Cofaktor durch eine gezielte Parallelreaktion in seinen Ausgangszustand zurückgewandelt. Damit steht er der erneuten Produktbildung wieder zur Verfügung. Eine solche Cofaktorregenerierung ist in Abbildung 2-2 am Beispiel der Produktion eines Alkohols und der Formiatdehydrogenase als cofaktorregenerierendes System verdeutlicht. Die Cofaktorregenerierung wird bei der Verwendung von cofaktorabhängigen Enzymen schon seit einiger Zeit angewendet.

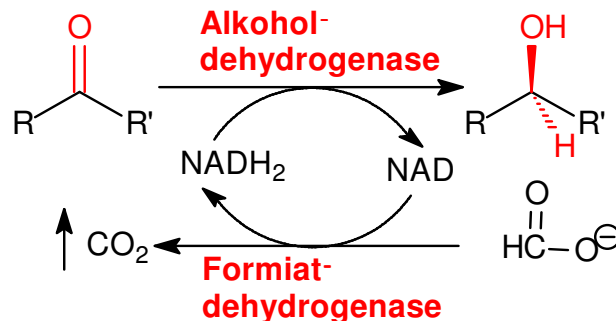


Abbildung 2-2: Prinzip der Cofaktorregenerierung

Wichtige Kriterien für die erfolgreiche Anwendung der Cofaktorregenerierung sind:

- Hohe Recyclingzahl/Zykluszahl des Cofaktors: diese Zahl gibt an, wie viel Mol Produkt pro Mol verbrauchtem Cofaktor gebildet wird (siehe Formel 2-1).
- Gute Biokompatibilität mit den produzierenden Enzymen (den Oxidoreduktasen)
- Wenig Nebenprodukte und eine einfache Produktisolierung

$$\text{turn-over-Zahl} = \frac{n_{\text{Produkt}} [\text{mol}]}{n_{\text{Cofaktor}} [\text{mol}]}$$

$n_{\text{Produkt}}$ : Menge des erhaltenen Produktes  
 $n_{\text{Cofaktor}}$ : Menge des verbrauchten Cofaktors

Formel 2-1: Turn-over-Zahl

Es gibt unterschiedliche Art und Weisen, den Cofaktor zu regenerieren. Die vier Hauptwege sind (nach [169]):

- Elektrochemische Cofaktorregenerierung
- Chemische und photochemische Cofaktorregenerierung
- Enzymatische Cofaktorregenerierung
- Cofaktorregenerierung mit ganzen Zellen

Die Cofaktorregenerierung ist in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

### **2.3.1 Bedeutung der Cofaktorregenerierung bei der cofaktorabhängigen Herstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren und Alkoholen**

Ein Hauptanwendungsgebiet bei der Verwendung von wasserstoffübertragenden Coenzymen mit angeschlossener Cofaktorregenerierung ist die Herstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren und Alkoholen. Aminosäuren kommen in natürlicher Weise in den Stoffwechselvorgängen von Lebewesen vor, entweder als Bausteine verschiedener Proteine und Peptide oder als nicht-proteinogene Aminosäuren in anderen Stoffwechselprodukten. In der Produktion von Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen spielen gerade enantiomerenreine Aminosäuren und Alkohole eine große Rolle. Da jedoch auf rein chemischem Weg die Herstellung von enantiomerenreinen Produkten sehr aufwendig ist, wird gerne auf die Herstellung dieser Produkte mit Hilfe von Biokatalysatoren wie Enzymen zurückgegriffen. Da Oxidoreduktasen, welche die Reaktionen zu diesen Produkten katalysieren, wasserstoffübertragende Cofaktoren wie NAD(H) oder NADP(H) benötigen, diese aber aus Kostengründen nicht in einem stöchiometrischen Verhältnis dazugegeben werden können (siehe Abschnitt 2.2), kommt der Cofaktorregenerierung bei der Produktion von enantiomerenreinen Aminosäuren und Alkoholen durch Oxidoreduktasen eine große Bedeutung zu.

Viele Ketone und Ketosäuren, welche als Substrate für die Produktion von chiralen Alkoholen und Aminosäuren genutzt werden, sind besser in organischen Medien als in Wasser löslich. Daher sind einige neuere Entwicklungen in der Cofaktorregenerierung entwickelt worden, wie z.B. der Einsatz von 2-Phasen-Systemen [47;48]. Die unterschiedlichen Methoden der Cofaktorregenerierung werden im Folgenden erläutert.

### **2.3.2 Elektrochemische Cofaktorregenerierung**

Bei der elektrochemischen Cofaktorregenerierung wird der Cofaktor NAD/NADH bzw. NADP/NADPH mit Hilfe einer Elektrode oxidiert bzw. reduziert und damit wieder in seinen Ausgangszustand versetzt. Dem Coenzym wird von einer Elektrode elektrochemisch 2 Elektronen zugeführt (Reduktion des Cofaktors) oder abgeführt (Oxidation des Cofaktors) (siehe Abbildung 2-3).

Dies kann direkt geschehen, mit Hilfe eines zwischengeschalteten Mediators als indirekte elektrochemische Regenerierung oder mit Hilfe des Zusatzes eines chemischen Mediators und eines Enzyms [53]. Das Prinzip ist am Beispiel der kathodischen Reduktion von NAD(P)<sup>+</sup> in Abbildung 2-4 schematisch dargestellt.

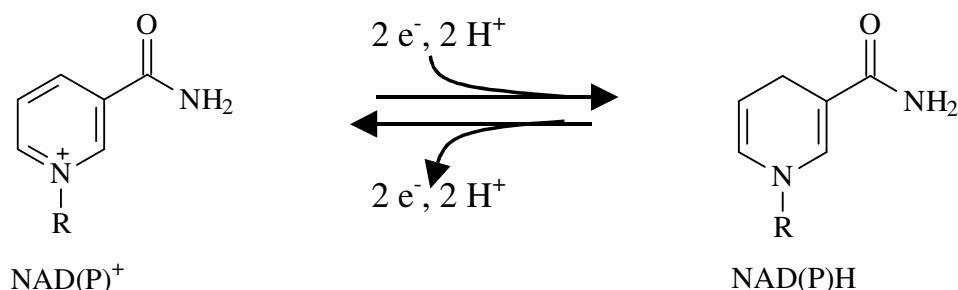


Abbildung 2-3: Prinzip der elektrochemischen Cofaktorregenerierung

Die direkte elektrochemische Regenerierung (1) ist die einfachste Methode. Der zu regenerierende Cofaktor reagiert dabei direkt mit der Elektrode. Dazu sind jedoch hohe Potentiale an der Elektrode notwendig [20;53;109;114], welche je nach Material der Elektrode bis zu +1000 mV für die anodische Oxidation und bis zu –1700 mV für kathodische Reduktion des Cofaktors betragen [53]. Diese hohen Potentiale können zwar durch eine spezielle Oberflächenbehandlung der Elektrode gesenkt werden, sind aber häufig trotzdem noch so hoch, dass sie nicht biokompatibel sind und eine teilweise Inaktivierung des Cofaktors und der Oxidoreduktasen nach sich ziehen können. Bei der kathodischen Reduktion des Cofaktors liegt ein weiterer Nachteil vor: durch den direkten Kontakt und das hohe elektrische Potential bilden sich Radikale.

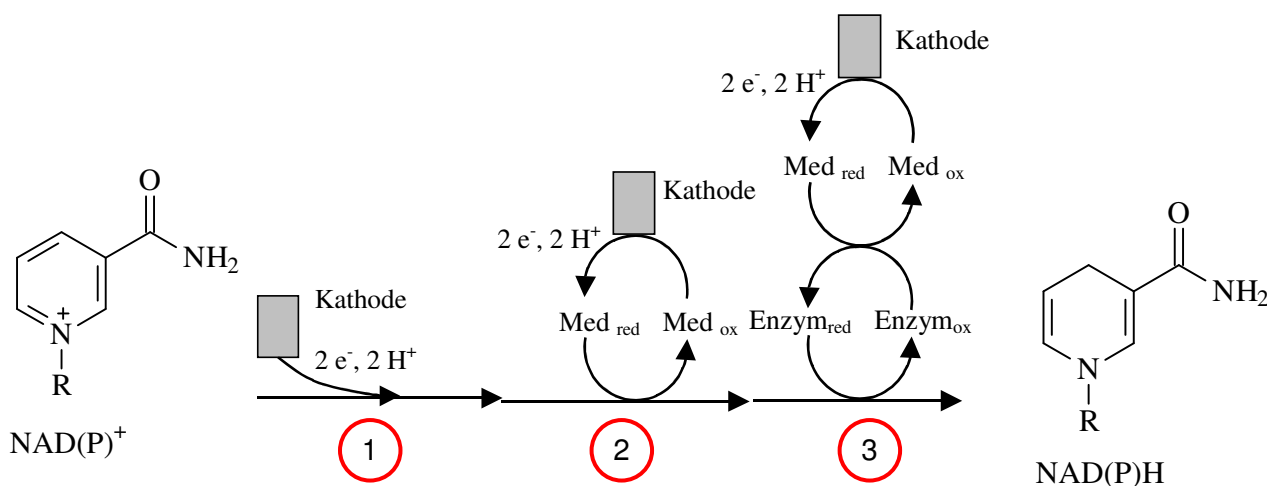


Abbildung 2-4: 3 Möglichkeiten der elektrochemischen Cofaktorregenerierung am Beispiel der kathodischen Reduktion von NAD(P):

1. Direkte Reduktion des Cofaktors an der Kathode
2. Indirekte Reduktion des Cofaktors mit Hilfe eines Mediators ( $\text{Med}_{\text{red}}$ ,  $\text{Med}_{\text{ox}}$ )
3. Indirekte elektroenzymatische Reduktion des Cofaktors mit Hilfe eines Enzyms und eines Mediators

Daher wurde eine weitere Form der elektrochemischen Cofaktorregenerierung entwickelt, die indirekte elektrochemische Regeneration (2). Dabei wird zwischen den Elektronentransfer von Elektrode zu Cofaktor ein chemischer Mediator zwischengeschaltet, welcher die Elektronen von der Elektrode zu den Cofaktoren transportiert. Dabei wurden unterschiedlichste Anwendungsarten entwickelt: Der Mediator ist entweder frei beweglich oder kann an die Elektrodenoberfläche immobilisiert sein [3;43;53;118]. Auch der Cofaktor selbst oder die Oxidoreduktase kann mit immobilisiert sein [53]. Diese Methode ist vielversprechender und effizienter, vor allem was die präparative Oxidation durch Dehydrogenasen anbelangt [53].

Die dritte, in Abbildung 2-4 dargestellte Form der elektrochemischen Cofaktorregenerierung ist die elektroenzymatische Regenerierung. Dabei wird zwischen den Elektronentransfer von Mediator zu Cofaktor noch ein enzymatischer Schritt gelegt. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer wesentlich höheren Geschwindigkeit des Elektronentransfers. Daher liegt das Hauptanwendungsgebiet in der Herstellung von enzymbasierten Biosensoren aus Dehydrogenasen. Mediatoren, Enzyme und Cofaktoren sind dabei an der Sonde immobilisiert. Vor allem in der Cofaktorregenerierung von NAD(P)H wird diese elektroenzymatische Methode auch in der Produktion unterschiedlicher Substanzen eingesetzt.

Insgesamt liegen die Vorteile der elektrochemischen Cofaktorregenerierung in den geringen Stromkosten, in der einfachen Produktaufreinigung, darin, dass kein Regenerierungsreagenz in stöchiometrischer Menge hinzugegeben werden muß und in dem einfachen Monitoring des Reaktionsfortschrittes. Demgegenüber jedoch bedarf es einem großen Aufwand für Apparate und Prozesse. Auch die Inkompatibilität mit vielen biologischen Systemen sowie die häufig geringe Selektivität sind große Nachteile. Ein weiteres Problem stellt das häufig schnelle „Elektrodenfouling“ dar [169]. Außerdem enthalten die verwendeten Mediatoren oft Schwermetalle wie z.B. Rhodium, was ökologisch bedenklich ist.

### **2.3.3 Chemische und photochemische Cofaktorregenerierung**

Innerhalb der Regenerierung von NAD(P) kann die photochemische Cofaktorregenerierung mit der elektrochemischen Cofaktorregenerierung gekoppelt sein. Dabei kann die Strahlung entweder den Elektronentransfer vom Cofaktor auf den Mediator beschleunigen oder den Elektronentransfer zwischen Mediator und Elektrode erleichtern.

Eine weitere Möglichkeit ist die Nutzung von photosensitiven Farbstoffen wie Metylen Blau oder N-methylphenazoniummethylsulphat. In solch einer Photoredoxreaktion können diese Stoffe durch Anregung mit Lichtenergie NADH zu NAD<sup>+</sup> unter Elektronenaufnahme oxidieren

[169]. Beispiele hierfür ist die Produktion von Acetaldehyd oder Ribulose – 5 – phosphat aus Ethanol oder 6 – P – Gluconat [61]. Ein Forschungsgebiet sind in diesem Zusammenhang auch phototrophe Organismen wie Algen oder Pflanzen. Diese nutzen die Sonnenenergie direkt, um NADP zu NADPH in einem photosynthetischen Elektronentransfer umzuwandeln. Das NADPH wird dann zur Reduktion von  $\text{CO}_2$  aus der Luft zu dem Energielieferanten Zucker benötigt. Vor allem Cyanobakterien stehen dabei im Fokus. Sie sollen mit Hilfe von Licht den Cofaktor NADP zu NADPH regenerieren, welcher dann zur Reduktion von Substraten zur Verfügung steht [169]. Dieses Prinzip wurde bei der Reduktion von Ketonen schon erfolgreich demonstriert [110].

Der Vorteil der photochemischen Cofaktorregenerierung liegt in der billigen Energiequelle Sonnenenergie sowie darin, dass keine Enzyme und stöchiometrischen Mengen an Regenerierungsreagenzien benötigt werden. Allerdings werden oft komplexe Apparate sowie photosensitive Stoffe und Redoxfarbstoffe gebraucht. Außerdem gibt es Einschränkungen in der Stabilität und das System mit der Verwendung von photosensitiven Stoffen und Redoxfarbstoffen ist häufig nur bedingt mit biologischen Systemen kompatibel.

Die rein chemische Cofaktorregenerierung basiert auf der direkten chemischen Reduktion von NAD(P). Es wird bevorzugt Wasserstoff mit Hilfe eines Rhodium- oder Rutheniumkomplexes eingesetzt, da dadurch keine Nebenprodukte entstehen. Das Verfahren ist zwar relativ billig, es müssen keine Enzyme zugegeben werden und auch die hohen Redoxpotentiale der Reaktionen sind von Vorteil. Trotzdem überwiegen die Nachteile dieses Verfahrens: es ist nur eingeschränkt biokompatibel und hat oft ungewollte Nebenprodukte, was eine schlechte Produktisolation zur Folge hat sowie eine niedrige Ausbeute. Außerdem ist die Verwendung von Schwermetallen wie Rhodium und Ruthenium ökologisch nicht wünschenswert und bringt oft die Notwendigkeit aggressiver Reaktionsbedingungen mit sich. Daher wurden nur wenige Prozesse mit rein chemischer Cofaktorregenerierung entwickelt [169].

### **2.3.4 Enzymatische Cofaktorregenerierung**

Die am besten erforschte und geeignete Methode ist die enzymatische Cofaktorregenerierung. Hier werden die Cofaktoren durch den Einsatz von Enzymen regeneriert (siehe Abbildung 2-2, Abbildung 2-5). Im Folgenden wird nur auf die Regeneration von NADH eingegangen, da diese bei der Herstellung von chiralen Alkoholen und Aminen die größte Bedeutung hat.

Es gibt die Möglichkeit, dass das cofaktorregenerierende Enzyme dasselbe ist wie das Produktionsenzym (siehe Abbildung 2-5).

In diesem Fall ist der Zusatz eines zweiten Substrates (z. B. Isopropanol) notwendig, welches das Enzym während der Cofaktorregenerierung ebenfalls umwandeln kann. Diese substratgekoppelte Cofaktorregenerierung kommt jedoch eher in unkonventionellen Reaktionsmedien vor, wie in Gas-/Festphasen [137] oder in organischen Medien [4;5;94;105;163].

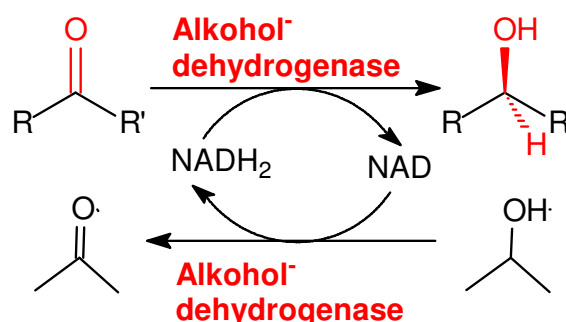


Abbildung 2-5: Substratgekoppelte Cofaktorregenerierung mit einer Alkoholdehydrogenase und Isopropanol als Substrat

Eine häufige Problematik ist dabei, dass das zweite Substrat (in Abbildung 2-5 Isopropanol) in großen Mengen zugegeben werden muss, um das thermodynamische Gleichgewicht der enzymatischen Reaktion auf die Seite der Cofaktorregenerierung zu verschieben. Dies ergibt einerseits Löslichkeitsprobleme des Substrates in Wasser, andererseits können sich diese hohen Konzentrationen negativ auf die Stabilität des Enzyms auswirken. Die substratgekoppelte Anwendung ist von besonderem Interesse bei stereospezifischen Reduktionen mit wasserunlöslichen Ketonen, um enantiomerenreine Alkohole und verwandte Produkte zu erhalten [57;79]. Für die Gewinnung enantiomerenreiner Alkohole aus Ketonen gibt es auch Untersuchungen in einem Zweiphasen-System (siehe auch Kapitel 2.1).

Häufiger ist die Verwendung eines separaten, cofaktorregenerierenden Enzyms. Diese Methode wurde mit vielen verschiedenen Enzymen und unterschiedlichen Verfahrensweisen entwickelt. In Tabelle 2-3 sind die einige Enzyme aufgelistet. Diese Art der Cofaktorregenerierung ist gerade für die Herstellung chiraler Alkohole und Aminosäuren mit Hilfe von Oxidoreduktasen am effektivsten und zeigt hohe Zyklenzahlen [102]. Besonders geeignet sind Regenerierungsenzyme, welche kostengünstige Substrate benötigen, einfach entfernbare Produkte herstellen, durch ihre Substrate und Produkte die eigentliche Produktsynthese und die Stabilität der Cofaktoren und der Enzyme nicht beeinträchtigen und selbst stabil gegenüber verschiedenen Prozessbedingungen sind. Dabei stellt sich die Formiatdehydrogenase (FDH) als am geeignetsten heraus. Dieses Enzym benötigt das



kostengünstige Substrat Formiat und bildet während der Reaktion Kohlendioxid, was die Produktaufreinigung erleichtert und das thermodynamische Gleichgewicht der Enzymreaktion in Richtung der NADH-Regeneration verschiebt bzw. die Reaktion durch das Entweichen des Kohlendioxids fast irreversibel werden lässt. Weder Substrat noch Produkt sind dafür bekannt, NAD/NADH zu destabilisieren.

Tabelle 2-3: Einige zur Cofaktorregenerierung angewendete Enzyme

| Enzym                            | Herkunft   | Coenzym     | Substrat                               | Ref.   |
|----------------------------------|--|-------------|--|--|
| Alkoholdehydrogenase             | Pferdeleber, Hefe, <i>Thermoanaerobium brokii</i>                  | NADH /NADPH | Ethanol, Methanol                      | [35;85;97;163]                               |
| Aldehyddehydrogenase             | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                    | NADH NADPH  | Propionaldehyd, Acetaldehyd            | [157]  |
| Glucosedehydrogenase             | <i>Bacillus subtilis</i>   | NAD(P)H     | Glucose                                | [51;58;93]                                   |
| Glucose-6-phosphat Dehydrogenase | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | NADPH NADH  | Glucose-6-Phosphat<br>Glucose-6-Sulfat | [176;179]                                    |
| Formiatdehydrogenase             | <i>Candida boidinii</i><br><i>Arthrobacter sp. KM62</i>            | NADH        | Formiat                                | [72;74;79;87;97;118;120;136;134;142;143;154] |
| Hydrogenase                      | <i>Alcaligenes eutrophus</i>                                       | NADH        | H <sub>2</sub>                         | [1;105]                                      |
| Phosphit Dehydrogenase           | k. A.  | NADH        | Phosphit                               | [132]  |
| Malic enzyme                     | <i>E.coli</i>  | NADH        | Malat                                  | [102]  |

Nachteilig sind der hohe Preis der FDH (FDH aus *C. boidinii*: 437 €/1000 U, Fluka), die geringe spezifische Aktivität von 2-11 U/mg [141] und die Instabilität der FDH besonders gegenüber organischen Substanzen sowie in technischen Prozessen [47;148]. Da die Anwendung der FDH als cofaktorregenerierendes Enzym Gegenstand dieser Arbeit ist, wird in Abschnitt 2.4 gesondert darauf eingegangen.

Weitere geeignete Enzyme sind die Glucosedehydrogenase und malic enzyme aufgrund ihrer günstigen Substrate und Produkte. Alkoholdehydrogenase, Aldehyddehydrogenase, Galactosedehydrogenase, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und Hydrogenase haben den Nachteil, dass entweder die Substrate zu kostspielig sind, Substrat oder Produkt andere Enzyme inaktivieren oder die Enzyme selbst (z.B. Hydrogenasen) gegenüber oxidierenden Reagenzien instabil sind [20;102]. Ein neueres, viel versprechendes Enzym stellt die Phosphit Dehydrogenase aufgrund des günstigen Substrates Phosphit dar [132], allerdings steht die Entwicklung hier noch am Anfang.

In der Anwendung der enzymatischen Cofaktorregenerierung sind unterschiedliche Verfahren bekannt. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei die Rückhaltung der Enzyme durch geeignete Methoden. Dies kann durch die Immobilisierung der Enzyme an geeignete Träger oder die Rückhaltung der löslichen Enzyme durch z.B. einen Enzym-Membran-Reaktor geschehen (siehe Kapitel 2.5 und 2.5.2.1). Letzteres ist ein kontinuierlich durchflossenes Reaktionsgefäß mit einer Ultrafiltrationsmembran, welche zwar große Moleküle wie Proteine zurückhält, aber für kleinere Substanzen wie Substrate und Produkte durchlässig ist. Dieses Verfahren wurde im Forschungszentrum Jülich entwickelt und seitdem für die Herstellung chiraler Alkohole, Hydroxysäuren und Amine mit enzymatischer Cofaktorregenerierung vielfach angewendet und weiterentwickelt [36;56;72;73;75;80;124;166;171;175].

### **2.3.5 Cofaktorregenerierung mit ganzen Zellen**

Eine weitere biokatalytische Methode ist die Regenerierung des Cofaktors innerhalb einer Zelle. Mikroorganismen, welche Cofaktorregenerierung innerhalb der Zelle natürlicherweise vollziehen, werden schon seit längerer Zeit in der Industrie zur Herstellung chiraler Alkohole aus Ketonen benutzt. Besonders häufig wird dabei die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet, da sie einfach in der Herstellung und der Behandlung sowie ungiftig ist und ein großes Substratspektrum toleriert. Allerdings werden häufig unerwünschte Nebenprodukte gebildet, die Produkte sind nicht optisch sauber, das Wachstum wird durch Substrate oder Produkte inhibiert, die Hefen haben bei vielen Produkten eine niedrige Produktivität. Daher wurden in jüngster Zeit genetisch veränderte Mikroorganismen hergestellt, welche die genetische Information zur Produktion eines cofaktorregenerierenden Enzyms (z.B. FDH) und eines Produktionsenzym wie einer Oxidoreduktase besitzen. Zumeist sind dieses *E.coli* Zellen, welche die entsprechende Plasmide als Expressionssystem besitzen. Nachdem die Biomasse dieser Zellen hergestellt und die Expression der Enzyme induziert wurde, werden die Ganzzellkatalysatoren für Biotransformation möglichst in ruhendem Zustand verwendet. Sie besitzen dabei aufgrund fehlender Kohlenstoffquellen keinen aktiven Stoffwechsel, sondern setzen nur das gewünschte Substrat um. Im Gegensatz zu der Verwendung isolierter Enzyme zur Cofaktorregenerierung werden bei der Verwendung von Ganzzellkatalysatoren die Enzymaufreinigungskosten gespart, was dieses System kostengünstiger macht. Allerdings kann es zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte kommen, welche genau wie eventuelle Zellbestandteile die Produktaufreinigung erschweren können [41;102].

Es wurden in letzter Zeit mehrere rekombinante Ganzzellkatalysatoren mit Oxidoreduktasen und cofaktorregenerierenden Enzymen entwickelt. Einige Beispiele sind im Folgenden genannt:

1. **Galkin et al. 1997 [41]:** Herstellung rekombinanter *E. coli*-Zellen, die über eine heterolog gebildete Aminodehydrogenase (z.B. Alanindehydrogenase *B. stearothermophilus*) und Formiatdehydrogenase (FDH aus *Mycobacterium vaccae* N10) verfügen und damit optisch aktiver L- und D-Aminosäuren mit Cofaktorregenerierung produzieren können. Es konnten damit Aminosäuren wie L-Leucin, L-Norleucin, L-Valin, L-Norvalin, L-Methionin, L- $\alpha$ -Aminobutyrat, L-Alanin, L-Phenylalanin und L-Tyrosin synthetisiert werden.
2. **Kataoka et. al 1997 [66]:** Herstellung eines Ganzzellkatalysators, welcher die rekombinanten Gene einer Aldehydreduktase aus *Sporobolomyces salmonicolor* und einer Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megaterium* exprimieren kann. Damit kann aus Ethyl-4-chloro-3-oxobutanoat das Produkt Ethyl-4-chloro-3-hydroxybutanoat gebildet werden. Um das hierfür benötigte NADPH aus NADP zu regenerieren, wandelt die Glucosedehydrogenase Glucose zu Glucono- $\gamma$ -Lacton um.
3. **Weckbecker et al. 2004 [168]:** Herstellung rekombinanter *E.coli* Zellen, welche 3 verschiedene Gene rekombinant exprimieren können. Dabei reduziert die NADP(H)-abhängige Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* prochirale Carbonylverbindungen (z.B. Acetophenon) zu chiralen Alkoholen (z.B. Phenylalkohol) wobei NADPH<sub>2</sub> zu NADP<sup>+</sup> oxidiert wird. Da in diesem Fall die NAD-abhängige FDH aus *Candida boidinii* das cofaktorregenerierende Enzym ist, wird ein drittes Enzym dazwischengeschaltet, die Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase aus *E. coli*. Dieses Enzym kann die Reduktionsäquivalente von NAD auf NADP übertragen, so dass zunächst NADP<sup>+</sup> von der Pyridin-Nukleotid-Transhydrogenase zu NADPH<sub>2</sub> regeneriert wird. Die hierfür benötigten Reduktionsäquivalente werden von dem von der FDH gebildeten NADH<sub>2</sub> genommen, welches dabei wieder in NAD verwandelt. Damit kann trotz der Verwendung eines NADP-abhängiges Produktionsenzym das viele Vorteile beinhaltende Enzym FDH zur Cofaktorregenerierung verwendet werden.
4. **Kaup et al. 2004/2005 [67;68]:** Herstellung rekombinanter *E.coli*-Zellen, welche eine Mannitoldehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* und eine FDH aus FDH aus *Mycobacterium vaccae* N10 exprimieren konnten. Damit konnte aus D-Fructose D-Mannitol hergestellt werden. Um den Transport in die Zelle zu erleichtern, wurde zusätzlich noch das Gen für ein Glucose-Facilitator-Protein aus *Zymomonas mobilis* in die Zelle hineinkloniert.
5. **Ernst et al. 2005 [37]:** Herstellung eines Ganzzellkatalysator mit den rekombinanten Genen der Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* N10 und der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*. Damit konnten bestimmte Ketone oder Ketosäuren in die entsprechenden chiralen Alkohole bzw. Hydroxysäureester

umgewandelt werden. Speziell wurde in diesem Fall aus Methylacetoacetat Methyl-(R)-3-hydroxybutanoat hergestellt.

## 2.4 Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* und Leucindehydrogenase (LeuDH) aus *Bacillus cereus*

In dieser Arbeit werden die Enzyme Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* und Leucindehydrogenase (LeuDH) aus *Bacillus cereus* zur Produktion der nicht-proteinogenen Aminosäure L-*tert*-Leucin aus Trimethylpyruvat genutzt. Die Reaktion ist schematisch in Abbildung 2-6 dargestellt.

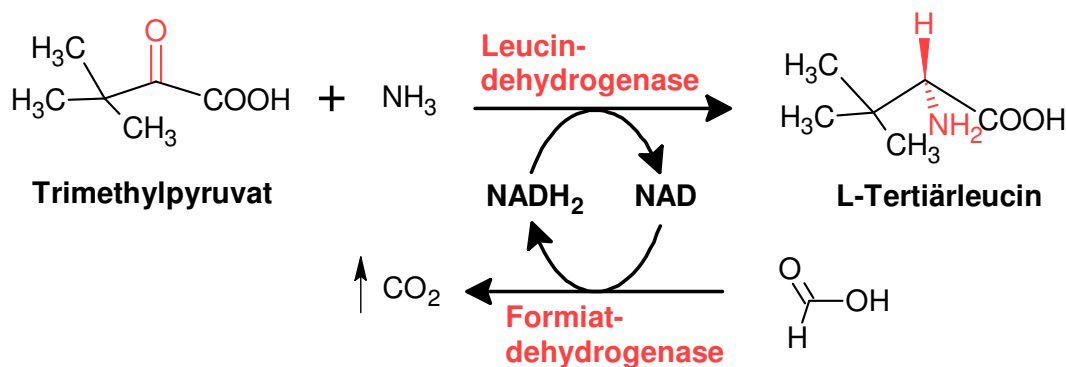


Abbildung 2-6: Cofaktorregenerierung mit FDH und LeuDH zur Produktion von L-*tert*-Leucin

### 1. Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

Formiatdehydrogenasen gehören zu der Klasse der Oxidoreduktasen und katalysieren die Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid. Sie kommen in vielen verschiedenen, vor allem methylotherphen, Mikroorganismen und Pflanzen vor.

In Pflanzen kommt die FDH hauptsächlich in den Mitochondrien vor und scheint ein Schockprotein zu sein, welches als Reaktion auf unterschiedliche Stressfaktoren wie Kälte, UV-Strahlung, chemische Reagenzien etc. gebildet [160] wird. Da diese FDH-Enzyme bisher kaum eine Anwendung finden, wird auf sie nicht weiter eingegangen.

Die FDHs von Mikroorganismen bestehen aus verschiedenen Gruppen, die sich stark in ihrer quaternären Struktur, zellulären Lokalisationen, Substratspezifität, Arten des Elektronenüberträgers und Vorhandensein bzw. Art einer prostetischen Gruppe unterscheiden [160]. Sie kommen hauptsächlich in methylotherphen Hefen vor, sind aber auch in einigen Bakterienarten vorhanden. Das durch die Formiatdehydrogenasen oxidierte Formiat kann einerseits in der anaeroben Atmung als Elektronendonator für die Reduktion von

Elektronenakzeptoren wie Nitrat, Fumarat oder DMSO dienen [102;167], wie zum Beispiel bei anaerob exprimierten FDH's aus *E.coli* oder als Substrat für die Methanogenese z. B. in methanogenen und chemoautotrophen Bakterien.

Eine andere Gruppe, zu der auch die FDH aus *Candida boidinii* gehört, sind die NAD<sup>+</sup>-abhängigen FDHs (E.C. 1.2.1.2.). Diese FDH's benötigen normalerweise keine Metallionen oder prostetischen Gruppen, bestehen aus zwei identischen Untereinheiten und besitzen ein Molekulargewicht von 70-100 kDa. Sie sind hoch spezifisch für die Substrate Formiat und NAD und weisen ein großes pH-Optimum auf [160]. Allerdings haben sie häufig eine geringe spezifische Aktivität [141] und eine relativ geringe Affinität zu dem Formiat-Ion (K<sub>m</sub>-Werte zwischen 2 und 40 mM) [141]. Zu der Gruppe der Bakterien und Hefen, die diese FDH's exprimieren, gehören die methylotrophen Mikroorganismen. Bakterielle FDH's sind unter anderem in *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas sp. 101* und *Paracoccus denitrificans* vorhanden. Methylotrophe Hefen mit Formiatdehydrogenase sind zum Beispiel *Hansenula polymorpha*, *Pichia farinosa*, *Candida methylica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* und *Candida boidinii*.

In methylotrophen Mikroorganismen spielen die FDH's in der Methanoldissimilation eine Rolle und dienen durch die Produktion von NADH und der Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid der Energiegewinnung der Mikroorganismen (Abbildung 2-7).

Möglicherweise dient die FDH auch dazu, cytotoxisch hohe Formiatkonzentrationen zu senken [135;152].

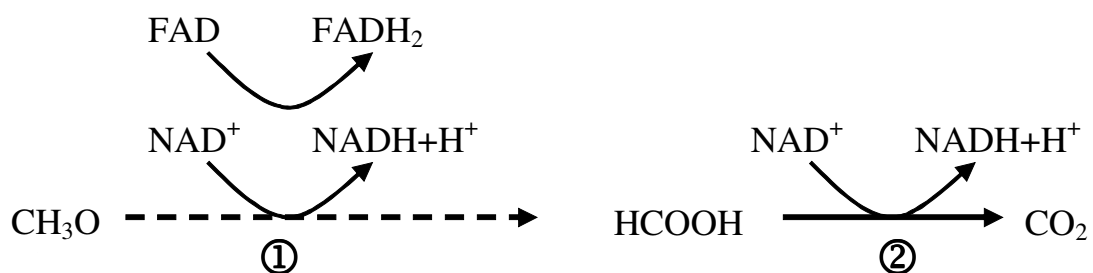


Abbildung 2-7: vereinfachte, schematische Darstellung der Methanoldissimilation in *Candida boidinii* [152]:

- ① Oxidation von Methanol zu Formiat über mehrere Zwischenschritte (nicht dargestellt) durch die Methanoloxidase, die Formaldehyddehydrogenase und die S-Formyl-glutathionhydrolase
- ② Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid durch die Formiatdehydrogenase

Die Formiatdehydrogenase von *Hansenula polymorpha* und danach die FDH von *Pseudomonas sp. 101* waren die ersten FDHs, deren Gen geklont wurde.

Vorteile von Formiatdehydrogenasen als cofaktorregenerierende Enzyme sind (2.3.4):

- Irreversible Reaktion von Formiat zu  $\text{CO}_2$ 
  - ⇒ thermodynamisches Gleichgewicht der Reaktion in Richtung Cofaktorregenerierung, keine zusätzliche Produktaufreinigungsproblematik
- breites pH-Wert-Optimum von pH 5,5-11
  - ⇒ pH-Wert des Prozesses kann an das pH-Wert-Optimum des jeweiligen Produktionsenzymes angepasst werden.
- Formiat als Substrat ist kostengünstig und überall erhältlich
- Formiat und  $\text{CO}_2$  haben bei den meisten Enzymen keinen negativen Einfluß auf die Aktivität

In dieser Arbeit wurde die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* verwendet. Wie oben schon erwähnt, gehört sie zu den  $\text{NAD}^+$ -abhängigen FDH's. Sie wurde bereits von unterschiedlichen Arbeitsgruppen aufgereinigt und charakterisiert [66;82-86;138;141;145;148]. Das Molekulargewicht beträgt  $74000 \pm 3000$  [145] und der Isoelektrische Punkt, also der pH-Wert, bei dem die FDH neutral ist, liegt bei 5,4 [83]. Die räumliche Struktur ist der Struktur der FDH aus *Pseudomonas sp. 101* wahrscheinlich sehr ähnlich [152] (siehe Abbildung 2-8).

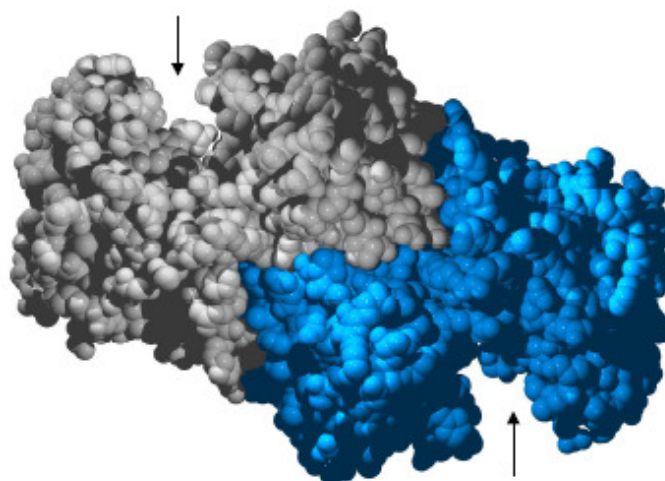


Abbildung 2-8: dreidimensionale Kristallstruktur der FDH aus *Pseudomonas sp. 101* [152] Dargestellt ist die Apo-Form, d.h., ohne Cofaktor und Substrat. Die beiden Untereinheiten sind zur besseren Unterscheidung farblich unterschiedlich dargestellt. Der Substratkanal des aktiven Zentrums jeder Untereinheit ist mit einem Pfeil angedeutet [86]. Wasserstoffe an den Kohlenstoffatomen sind nicht dargestellt.

Sie besteht, wie alle FDH's aus ihrer Gruppe, aus zwei gleichen Untereinheiten mit je einem aktiven Zentrum pro Untereinheit. Diese bzw. die Substratkanäle der aktiven Zentren sind mit Pfeilen in Abbildung 2-8 gekennzeichnet. Pro Untereinheit gibt es eine Cofaktor-bindende Domäne und eine katalytische Domäne. Die Cofaktor-bindende Domäne befindet sich nahe der Symmetrieachse des FDH-Dimers, während die katalytische Domäne an der Peripherie des Dimers liegt. Für die Reaktion ändert sich die Form vom Apoenzym zum Holoenzym so, daß das Formiat und das NAD in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, der Übergangszustand stabilisiert wird und die Reaktion ablaufen kann [152].



Abbildung 2-9: Reaktionsmechanismus der FDH aus *Candida boidinii*: Ordered Bi-Bi-Mechanismus

Der Reaktionsmechanismus der Oxidation des Formiats entspricht dem Ordered Bi-Bi-Mechanismus [66], wie er in Abbildung 2-9 zu sehen ist. Es bindet zunächst das NAD an das aktive Zentrum, erst danach kann das Formiat binden. Nachdem die Reaktion stattgefunden hat, wird erst das gebildete CO<sub>2</sub> freigesetzt, danach der reduzierte Cofaktor NADH<sub>2</sub>.

Tabelle 2-4: Kinetische Daten der FDH aus *Candida boidinii*

| Prozeßbedingungen              | K <sub>m</sub> -Wert NAD [mM] | K <sub>m</sub> -Wert Formiat [mM] | Spezifische Aktivität | pH-Optimum | Ref.     |
|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|------------|----------|
| pH 7,5, T=30 °C, Küvettentest  | 0,09                          | 13                                | 2,4                   | 7,5-8,5    | [145]    |
| pH 7,5, T=30 °C, Küvettentest  | 0,045                         | 5,6                               | 6,0                   | -          | [148]    |
| pH 7,5, T=25 °C, Küvettentest  | 0,04                          | 2,42                              | -                     | 7,5-8,5    | [84]     |
| pH 7,8, T=25 °C, Küvettentest  | 0,032                         | 1,7                               | -                     | 7-8,5      | [6]      |
| pH 8,0, EMR mit LeuDh          | 0,04                          | 8,7                               | 3,42                  | -          | [73]     |
| pH 8,0, T=37 °C, EMR mit LeuDh | 0,04, PEG-NAD                 | 43,69                             | 2,6                   | -          | [75]     |
| pH 8,0, T=40 °C, Küvettentest  | 0,3                           | 94,5                              | 1,24                  | -          | [80;170] |

Die kinetischen Daten der FDH aus *Candida boidinii* wurde vor allem von Schütte et al. [145] aber auch einigen anderen Wissenschaftlern ermittelt. Sie sind in Tabelle 2-4 in Abhängigkeit der Prozeßbedingungen aufgelistet. Wie dort zu sehen ist, bewegen sich die  $K_m$ -Werte für  $\text{NAD}^+$  im Bereich von 0,04-0,3 mM und für Formiat im Bereich von 2,4 bis 94, 5 mM. Die Affinität für den Cofaktor  $\text{NAD}^+$  ist anscheinend wesentlich stärker als die Affinität für Formiat, da die  $K_m$ -Werte für Formiat zwischen 60 und 300 fach größer sind als für  $\text{NAD}^+$ . Das pH-Optimum ist in 2 unterschiedlichen Literaturstellen auf pH 7,5-8,5 bestimmt worden. Die Schwankungen der  $K_m$ -Werte sind wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Meß- und Prozeßbedingungen sowie auf die unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten, welche ein Maß für den Aufreinigungserfolg und den Gehalt an Fremdprotein sind, zurückzuführen. Auch die Lagerung hat nach Schirwitz et al. [141] einen Einfluß auf die kinetischen Daten. So nimmt die spezifische Aktivität nach 2 Wochen Lagerung bei 4 °C (in 150 mM NaCl und 20 mM bis-tris Propan, pH 7,8) um 29 % und nach 4 Monaten um 86 % ab. Die  $K_m$ -Werte verringern sich nach 3,5 Monaten für NAD um den Faktor 1,75 und für Formiat um den Faktor 1,8.

Weitere Eigenschaften der FDH aus *Candida boidinii* sind:

- Temperaturoptimum für eine maximale Aktivität zwischen 45 °C und 55 °C [84]
- Stabilität:
  - Temperatur: -Inaktivierungstemperatur (20 min, 50 % Restaktivität): 57 °C [152]  
 -Halbwertszeit bei 50 °C, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5: > 300 min [148]
  - Prozeßstabilität: Halbwertszeit bei 30 °C, 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5: 328 min [152]
  - Stabilität gegenüber Prozeßparametern: Relativ instabil gegenüber
    - Leicht alkalischen pH-Werten [127]
    - Mechanische Belastung [82]
    - Erhöhter Ionenstärke [148]
    - geringe Oxidationsstabilität aufgrund der Oxidation von Cysteinresten durch Luftsauerstoff [127;148;152]
    - Kontaminationen durch Schwermetalle, insbesondere Kupfer [145;148]
- Inhibition der FDH durch:
  - Anionen wie Cyanat, Cyanit und Azid [145]
  - Metalle wie Kupfer, Quecksilber und *p*-Chloromercuribenzoate [145]



Die Instabilität gegenüber Luftsauerstoff und gegenüber Kupferionen konnte durch einen gezielten Austausch von zwei Cysteinresten durch Serinreste verbessert werden, allerdings sank damit die thermische Stabilität des Enzyms [83;152].

Das Substratspektrum der FDH ist sehr spezifisch für Formiat und NAD. NADP sowie andere Oxidantien wie Pyruvat, Malat oder Acetat werden nicht akzeptiert [145].

## 2. Leucindehydrogenase aus *Bacillus cereus*

Leucidehydrogenasen (EC 1.4.1.9) gehören ebenfalls zu den NAD/NADH<sub>2</sub>-abhängigen Oxidoreduktasen, speziell zu den Aminosäuredehydrogenasen. Sie katalysieren die reversible oxidative Desaminierung von L-Leucin und anderen aliphatischen, verzweigten (Valin, Isoleucin) und unverzweigten (Norleucin, Norvalin) L-Aminosäuren zu ihren Ketosäuren entsprechend Abbildung 2-10 und wurden bisher vor allem aus *Bacillus* Arten wie *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megatherium* und *Bacillus stearothermophilus* isoliert.

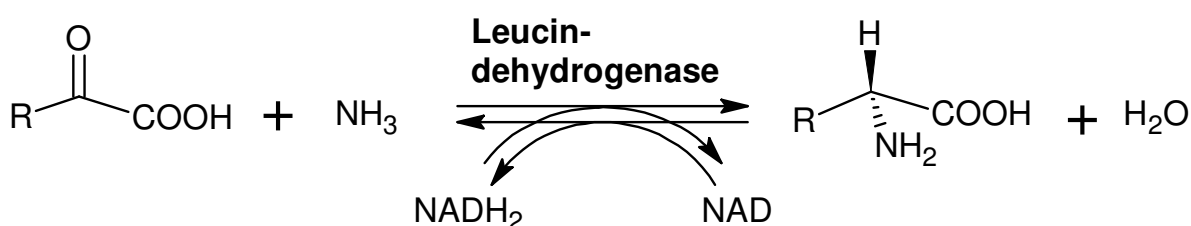


Abbildung 2-10: Reaktion der Leucindehydrogenase

Dort sind sie am Katabolismus von verzweigten, aliphatischen Aminosäuren sowie am Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus beteiligt [15;64] und spielen weiterhin eine wichtige Rolle in der bakteriellen Sporulation durch die Bildung von L-Leucin als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle [15;64].

Industrielle Bedeutung hat LeuDh aufgrund der Produktion von neuen, nicht-proteinogenen Aminosäuren wie z.B. L-*tert*-Leucin [64] für die pharmazeutische Industrie, und aufgrund der Anwendung in Biosensoren innerhalb der Diagnostik, z.B. zur Analyse von angeborenen Stoffwechselerkrankungen des Aminosäurestoffwechsels [64;69]. Ihre geringe Substratspezifität, wodurch unterschiedliche Substrate eingesetzt und unterschiedliche Produkte hergestellt werden können und ihre relativ hohe Konzentration in den *Bacillus*stämmen [56] machen sie zu interessanten technischen Biokatalysatoren.

Die Leucindehydrogenasen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen isoliert, aufgereinigt und bezüglich ihrer Eigenschaften untersucht [10;56;113;139;146;147;180]. Sie zeigen alle eine relativ hohe Thermostabilität und eine gute Prozessstabilität. Die pH-Optima liegen bei den meisten LeuDHs im alkalischen Bereich. Für die oxidative Desaminierung liegen sie zwischen 10 - 11 und für reduktive Aminierung zwischen pH 9-10 [15;56]

Im Folgenden wird auf die Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten LeuDH aus *Bacillus cereus* eingegangen. Sie wurde erstmalig von Sanwal et al. 1961 [139] isoliert und beschrieben. 1985 wurde sie von Schütte et al. in größerem Maßstab produziert und aufgereinigt und charakterisiert [146]. 2000 haben Ansorge et al. die LeuDH aus *Bacillus cereus* rekombinant in *E.coli* exprimiert und produziert [2]. Die Struktur wurde 1985 elektronenmikroskopisch von Lünsdorf et al. [96] aufgeklärt. Sie hat ein Molekulargewicht von 310 000 Da und besteht aus 8 identischen Untereinheiten [96;146], welche tetragonal angeordnet sind [96].

Da der Reaktionsmechanismus der LeuDH aus *Bacillus stearothermophilus* [113] identisch ist mit dem der LeuDH aus *Bacillus sphaericus* [147], könnte er auch identisch sein mit dem Reaktionsmechanismus der LeuDH aus *Bacillus cereus*. Dort reagiert die LeuDH bei der oxidativen Desaminierung entsprechend einem ordered Bi-Ter-Mechanismus [15] wie er in Abbildung 2-11 dargestellt ist. Zunächst bindet NAD, danach Leucin. Nach der Reaktion werden die Produkte in folgender Reihenfolge freigesetzt: 1. Ammonium, 2. Ketosäure, 3. NADH<sub>2</sub>. Der Reaktionsmechanismus der reduktiven Aminierung ist entsprechend ein ordered Ter-Bi-Mechanismus [77;113]. Zunächst wird dabei das NADH<sub>2</sub> gebunden. Durch die darauf folgende Konformationsänderung wird die Substrattasche erst für die Ketosäure geöffnet, die dann mittels Wasserstoffbrückenbindungen an einen Lysinrest (Lys68) fest gebunden wird [77;147].

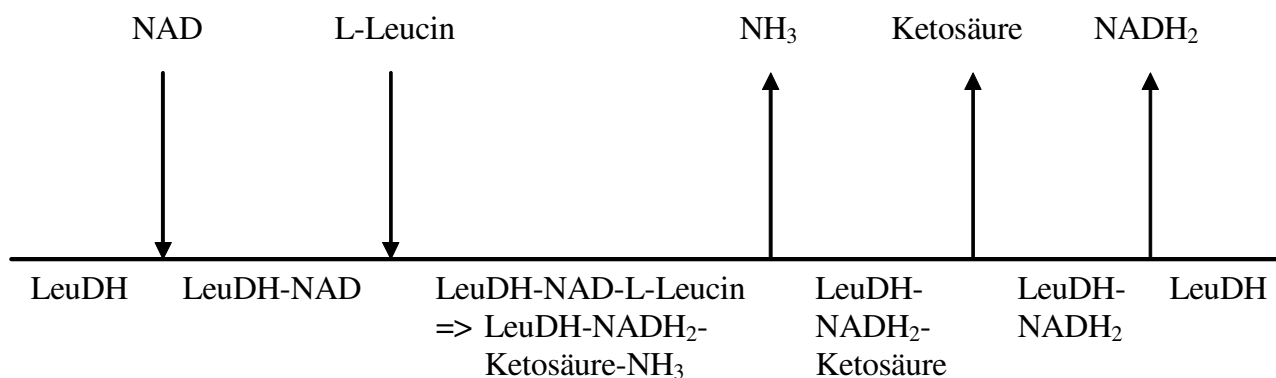


Abbildung 2-11: Möglicher Reaktionsmechanismus der LeuDH aus *B. cereus*: ordered Bi-Ter-Mechanismus [15]

Das Reaktionsgleichgewicht liegt auf der Seite der reduktiven Aminierung, speziell der Synthese von Leucin, was die LeuDH für die Aminosäureproduktion interessant macht [15;139;146]. Das Substratspektrum wurde von Bommarius et al. [10] genauer untersucht. Die besten Ergebnisse für die reduktive Aminierung in Bezug auf die Reaktionsgeschwindigkeit lagen bei der Verwendung von 2-Oxobuttersäure, 2-Oxo-3-Methyl-Buttersäure, 2-Oxo-3,3-dimethyl-Buttersäure (Trimethylpyruvat), 2-Oxopentansäure, 2-Oxo-3-Methylpentansäure, 2-Oxo-4-Methylpentansäure und 2-Oxo-4-Methylhexansäure vor [78]. Im Vergleich zu LeuDH's aus anderen *Bacillus*-Arten zeigte die LeuDH aus *Bacillus cereus* für das Substrat Trimethylpyruvat, welches durch die reduktive Aminierung zu L-*tert*-Leucin umgewandelt wird, das beste Resultat [67;68] und ist damit für dieses Substrat, welches in dieser Arbeit verwendet wird, der beste Katalysator [81]. In Bezug auf den Cofaktor ist die LeuDH aus *Bacillus cereus* sehr spezifisch für NAD, NADP wird als Cofaktor nicht akzeptiert. Das pH-Optimum für die reduktive Aminierung liegt je nach Substrat zwischen 8,5 und 9,5 [146]. Sie ist bis 50 °C für 30 min stabil, oberhalb dieser Temperatur nimmt die Stabilität rapide ab. Inhibitoren der LeuDH sind vor allem Quecksilberchlorid, aber auch Kaliumcyanid und p-Mercuribenzoat [146]. Da in dieser Arbeit Trimethylpyruvat als Substrat eingesetzt wurde, sind im Folgenden die kinetischen Daten für diese Reaktion angegeben (s. Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5: Kinetische Daten der LeuDH aus *Bacillus cereus*

| Prozessbedingungen           | K <sub>m</sub> (NADH) [mM] | K <sub>m</sub> (TMP) [mM] | K <sub>i</sub> (TMP) [mM] | K <sub>i</sub> (L- <i>tert</i> -Leucin) [mM] | Spez. Aktivität | Ref. |
|------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--|-----------------|------|
| pH 8,5, 30 °C                | k. A.                      | 17,7                      | k. A.                     | k. A.  | 11,7            | [77] |
| pH 9,5, 30 °C                | k. A.                      | 38,8                      | k. A.                     | k. A.  | 18,3            | [77] |
| pH 8,0, EMR mit FDH          | 0,022                      | 22                        | 1838                      | 24,6   | 19,1            | [73] |
| pH 8,0, T=37 °C, EMR mit FDH | 0,015, PEG NADH            | 36,6                      | k.A.                      | 38,9   | 5,2             | [72] |

Der K<sub>m</sub>-Wert für NADH ist ähnlich dem K<sub>m</sub>-Wert für den Cofaktor bei der FDH. Für das zweite Substrat, Trimethylpyruvat, ist die Affinität nicht so stark und der K<sub>m</sub>-Wert um den Faktor 100-200 geringer. L-*tert*-Leucin übt bei hohen Konzentrationen eine relativ starke Produkthemmung auf die LeuDH aus, während das nicht-natürliche Substrat Trimethylpyruvat nur leicht hemmt.

## 2.5 Immobilisierung von Enzymen

Als immobilisiert werden Biokatalysatoren bezeichnet, die durch chemische und/oder physikalische Methoden in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt worden bzw. fixiert sind und

welche dadurch wieder verwendbar sind. Dabei ist zwischen unterschiedlichen Arten der Immobilisierung zu unterscheiden. Entsprechend der Einteilung eines internationalen Gremiums auf der 1. Enzyme Engineering Conference 1971 in Henniker (USA) wird die Immobilisierung in 2 große Gruppen eingeteilt, wie es in Abbildung 2-12 gezeigt ist [52]:

- Immobilisierung durch Anbindung: gebundene, unlösliche Enzyme
- Immobilisierung durch Einschluss: eingeschlossene, freie Enzyme

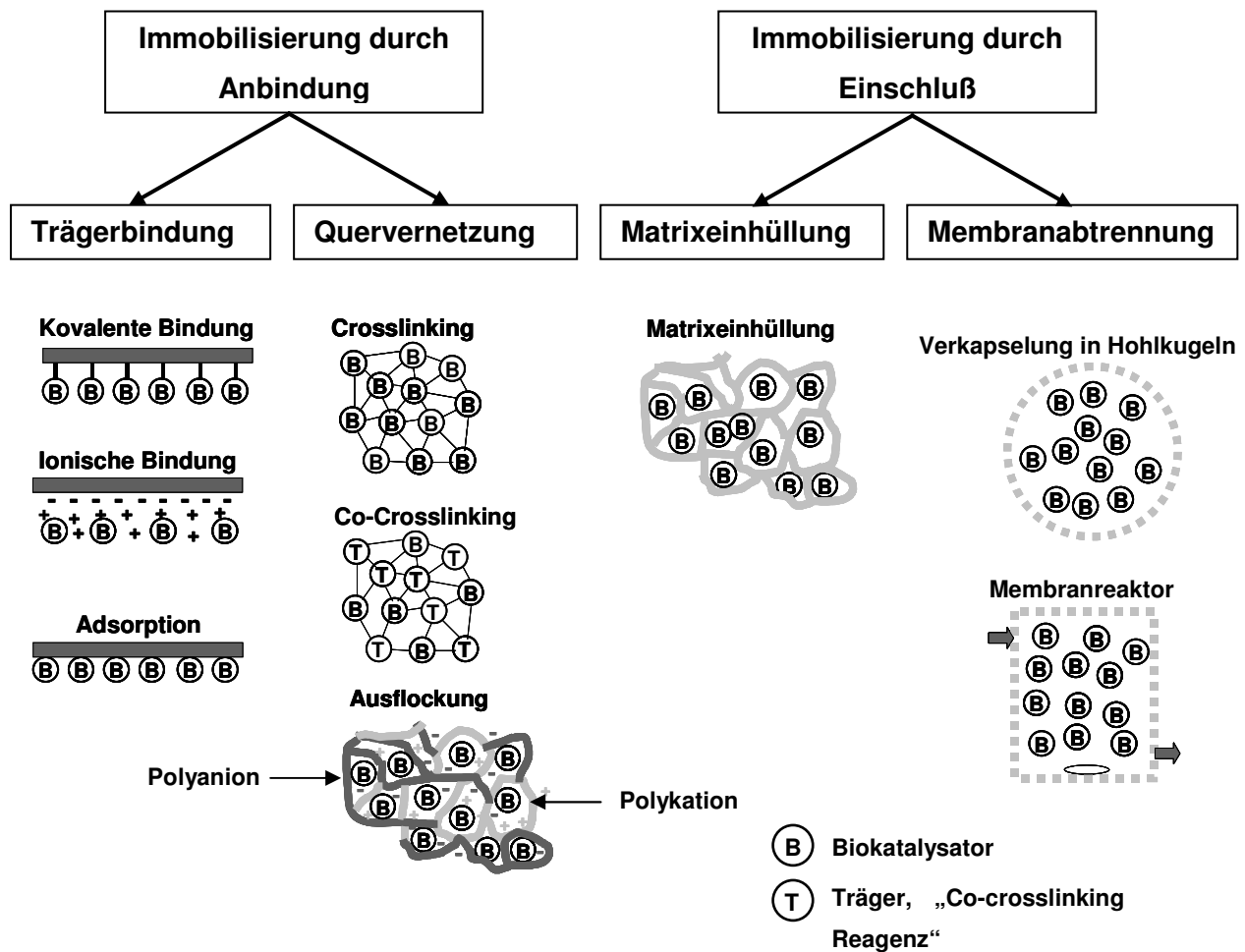


Abbildung 2-12: Einteilung und Darstellung der verschiedenen Immobilisierungsmethoden

Unter die Gruppe der gebundenen, unlöslichen Enzyme fällt die Immobilisierung an einen Träger durch Adsorption oder kovalente Bindung oder die Immobilisierung durch Quervernetzung wie Crosslinking oder Co-Crosslinking. Zu den freien, eingeschlossenen Enzymen gehört einerseits die Immobilisierung durch Matrixeinhüllung (Kugeln oder Fasern) und andererseits die Immobilisierung durch Membranabtrennung (Membranreaktoren,

Mikroverkapselung). In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Methoden näher erläutert.

Die Immobilisierung von Biokatalysatoren hat in der technischen Anwendung schon lange eine Bedeutung. Als eine der ersten Anwendungen ist von 1825 die Essigsäureherstellung aus alkoholhaltigen Lösungen bekannt [52]. Dabei wurde der Alkohol durch an Holzspäne adsorbierte Zellen von *Acetobacter* in Essigsäure umgewandelt. Die erste aus der Literatur bekannte Enzymimmobilisierung ist die adsorptive Bindung von Hefeinvertase an Aktivkohle zur Spaltung von Saccharose von Nelson und Griffin im Jahr 1916 [52]. Ab den 60er Jahren nahm die Forschung im Bereich der Immobilisierung von Enzymen stark zu, und im Jahr 1969 kam es zu der ersten industriellen Anwendung immobilisierter Enzyme in Japan [52]. Dabei wurden entsprechend den Arbeiten von Chibata mittels ionisch gebundener L-Aminoacylase L-Aminosäuren aus einem racemischen Gemisch von acylierten Aminosäuren hergestellt. Die Herstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren mit Hilfe von immobilisierten Biokatalysatoren hat sich stetig weiter entwickelt.

Eines der bedeutendsten Verfahren ist hierbei die Immobilisierung der Glucoseisomerase zur Herstellung von Glucosesirup, wobei unterschiedliche Immobilisierungsverfahren angewendet werden wie ionische und adsorptive Bindung an DEAE-Cellulose oder Quervernetzung mit Glutardialdehyd. Glucosesirup wird zur Süßung in Getränken und vielen anderen Lebensmitteln verwendet. Sein Produktionsvolumen wird auf ca. 11 Millionen Tonnen (2001) geschätzt [16]. In der pharmazeutischen Industrie spielt die Hydrolyse von Penicillin durch die immobilisierte Penicillinacylase eine große Rolle.

Vorteile der Immobilisierung einerseits die Wiederverwendbarkeit des Immobilisates. Dies spart Enzymkosten, was vor allem bei teuren Enzymen von Vorteil ist. Auch wird häufig eine größere Stabilität der immobilisierten Enzyme gegenüber den löslichen festgestellt, vor allem, wenn sie kovalent an den Träger gebunden sind. Die Abtrennbarkeit des Biokatalysators kann auch die Aufreinigungsaufwand des Produktes verringern, dies ist vor allem bei immobilisierten Zellen der Fall.

Nachteilig sind die zusätzlichen Kosten der Immobilisierung, welche nicht höher sein sollten als die oben genannten, ökonomischen Vorteile des Immobilisates. Auch ist nicht jedes Enzym für eine Immobilisierung, vor allem eine mit kovalenter Anbindung geeignet, da es nach der Immobilisierung zu Aktivitätsverlusten kommen kann. Weiterhin kann es zu Stoffübergangsproblemen wie Diffusionslimitierungen von Substrat und Produkt kommen, wenn das Immobilisat zu groß ist.

Wichtige Kriterien für eine erfolgreiche Immobilisierung sind:

- geringe Inaktivierung des Enzyms während des Immobilisierungsprozesses
- geringe Immobilisierungskosten und einfache Immobilisierungstechniken
- gute Langzeitstabilität des Biokatalysators, d.h. geringe Inaktivierung und geringes Leaching des Biokatalysators aus dem Immobilisat
- gute Stabilität des Immobilisates während des Prozesses
- geringe Diffusionsprobleme

Ob und wie Biokatalysatoren immobilisiert werden sollten, kann pauschal nicht gesagt werden, sondern hängt vom Einzelfall ab. Dabei spielen hauptsächlich ökonomische Gesichtspunkte wie Enzymkosten, Immobilisierungskosten, Produktausbeute, Prozesskosten etc. eine Rolle.

Die einzelnen Immobilisierungsmethoden werden im Folgenden erläutert und sind in Abbildung 2-12 anschaulich dargestellt. Es können auch Kombinationen der einzelnen Immobilisierungsmethoden genutzt werden. So können Enzyme z. B. zunächst adsorptiv gebunden werden und danach, um die Stabilität zu erhöhen, untereinander durch ein bifunktionales Reagenz quervernetzt werden [52].

## **2.5.1 Immobilisierung durch Anbindung**

### **2.5.1.1 Fixierung an einen festen Träger**

Die Bindung des Enzyms an einen festen Träger kann auf unterschiedliche Weise geschehen (siehe Abbildung 2-12).

- 1. Adsorption:** dieses ist die älteste Art der Immobilisierung. Dabei werden die Biokatalysatoren durch physikalische Kräfte wie van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen an die Oberfläche des Trägers gebunden. Dies ist eine relativ einfach durchführbare, schonende und kostengünstige Methode, hat aber den Nachteil, dass die Bindung häufig schwach ist und die Biokatalysatoren durch Änderung der Umgebungsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur, oder Substrat- und Ionenkonzentrationen wieder desorbiert werden können. Die Träger sind wasserunlösliche Stoffe aus z.B. Aktivkohle, Ton, Silicagel oder modifizierte Dextranen [52].
- 2. Ionische Bindung:** diese Methode basiert auf der elektrostatischen (ionischen) Anziehung zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen von Träger und Biokatalysator, vor allem Proteinen. Die Träger sind zumeist Ionenaustauscher auf der Basis von Polysacchariden und synthetischen Harzen, welche ionisch geladene Gruppen besitzen. Diese Immobilisierungsart ist ebenfalls einfach zu handhaben und

enzymschonend und wurde daher als eine der ersten Immobilisierungsmethoden großtechnisch eingesetzt. Allerdings ist sie störanfällig gegenüber bestimmten Ionenstärken und pH-Werten, was zur Ablösung der gebundenen Biokatalysatoren führen kann [16;52].

- 3. Kovalente Bindung:** hierbei werden die Enzyme durch eine chemische Reaktion an reaktive Gruppen des Trägers fest und kovalent gebunden. Dies ist zwar eine sehr stabile Verbindung, die chemischen Veränderungen und die belastenden Immobilisierungsbedingungen führen jedoch häufig zu Aktivitätsverlusten der Enzyme. Die Trägerstoffe sind entweder anorganische Stoffe wie poröses Glas, Keramik oder Kieselerde, organische Stoffe natürlicher Art wie Polysaccharide oder Proteine oder synthetische organische Stoffe wie Acrylat-/Acryamidderivate, Polyamide oder Polystyrolerivate. Diese werden zumeist mit Aktivierungsreagenzien versehen, welche die reaktive Gruppe für die chemische Anbindung besitzen, wie z.B. Glutardialdehyd, Bromcyanat, Chloressigsäure oder Isothiocyanat. Diese können mit den in Aminosäuren vorkommenden Sulfhydryl-, Carboxyl-, Hydroxyl-, Imidazol- oder Phenolgruppen des Biokatalysators reagieren. Bei den synthetischen Trägerstoffen kann die funktionellen Gruppen auch im vornherein durch Copolymerisation eingeführt werden, so dass die Zugabe von Aktivierungsreagenzien nicht notwendig ist. Ein Beispiel dafür ist Eupergit® der Firma Röhm. Hier wurden Oxirangruppen eingeführt, die das Enzym binden können [16;52].

#### 2.5.1.2 Quervernetzung

Bei der Quervernetzung werden die Biokatalysatoren selbst so miteinander verbunden, dass sie große, hochmolekulare, leicht abtrennbare und möglichst unlösliche Aggregate bilden. Dabei können unterschiedliche Methoden verwendet werden (siehe Abbildung 2-12).

- 1. Crosslinking und Co-Crosslinking durch kovalente Bindungen:** hierbei werden die Biokatalysatoren durch den Zusatz von bi- oder multifunktionalen Reagenzien kovalent miteinander verbunden. Diese Reagenzien können sein:

- Diisocyanate
- Diisothiocyanate
- Glutardialdehyd

Glutardialdehyd ist das am häufigsten angewendete Quervernetzungsreagenz. Dabei reagieren die reaktionsfähigen Aldehydgruppen an den beiden Enden des Glutardialdehyds mit den freien Aminogruppen des Biokatalysators zu einer Verbindung nach der Art einer Schiff'schen Base. Die Quervernetzung durch kovalente Bindung ergibt, wie auch die kovalente Anbindung an feste Träger, zwar ein sehr stabiles Immobilisat, allerdings können auch hier die chemischen

Veränderungen und die belastenden Immobilisierungsbedingungen zu Enzymaktivitätsverlusten führen. Das Co-Crosslinking beinhaltet zusätzlich die Einbindung eines inaktiven Moleküls in das Polymernetzwerk des Immobilisates. Dadurch ist generell das Verbessern der mechanischen und enzymatischen Eigenschaften des Immobilisates möglich. Beispiele für ein solches inaktives Molekül sind: Gelatine, Hühnereiweiß und Chitosan [16;52].

2. **Ausflockung:** Bei dieser schonenderen, relativ einfach zu handhabenden Vernetzungsmethode bilden die Enzyme entweder durch die Zugabe von organischen Lösemitteln oder Komplexbildnern, wie bei Ausfällung von Proteinen z.B. bei der Aufreinigung von Enzymen oder in der Abwasserwirtschaft, oder durch die Zugabe von Ionen oder ionischen Polyelektrolyten größere wasserunlösliche, aber hochgequollene Aggregate, welche sich vom Medium leicht abtrennen lassen [16;52]. Die Ausflockung von Enzymen mit Hilfe von Polyelektrolyten basiert auf den ionischen Anziehungskräften der Enzyme, die als Ampholyte je nach Umgebung positiv- und negativ geladene Gruppen (Carboxygruppen und Aminogruppen) besitzen und der Polyelektrolyte, die als Polyanionen oder Polykationen ebenfalls geladene Gruppen tragen. Diese Methode, Enzyme mit Hilfe von Polyelektrolyten auszuflocken und Immobilisate zu bilden, wurde unter anderem von Dautzenberg et al. untersucht und bereits erfolgreich angewendet [19]. Beispiele für Polyelektrolyten sind:

- **Polykationen:** Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC), Polyvinylamin, Polyethylenimin, Chitosan, Polyvinylamin, Polynatriumstyrolsulfonat
- **Polyanion:** Cellulosesulphat, Alginat, Sulfoethylcellulose, Polyacrylsäure, Carboxymethylcellulose, Polyallylaminohydrochlorid

Diese zwar schonendere Methode hat allerdings den Nachteil, dass die Immobilisate wie bei der ionischen Bindung durch bestimmte pH-Wertänderungen oder Ionenstärkenänderung wieder destabilisiert werden können.

### 2.5.2 Immobilisierung durch Einschluß

Bei der Immobilisierung durch Einschluß werden die Enzyme ohne eine direkte Fixierung in gelöster Form in einen umgrenzten Raum oder eine Matrix eingeschlossen (siehe Abbildung 2-12).

#### 2.5.2.1 Membranabtrennung

Hierbei werden die freien, ungebundenen Biokatalysatoren von einer semipermeablen Membran, die für die Enzyme undurchlässig ist, in einem definierten Raum eingeschlossen. Diese Methode ist enzymschonend und führt zu keinen großen Desaktivierungsverlusten. Es gibt dafür unterschiedliche Methoden.



- **Membranreaktor:** in diesem System werden die Enzyme von einer enzymundurchlässigen, aber substrat- und produkt durchlässigen Membran wie Ultrafiltrationsmembran oder Hohlfasermembran in einem relativ großen Reaktionsvolumen zurückgehalten. Diese Methode wurde am Forschungszentrum Jülich an dem Einsatz eines Enzym-Membran-Reaktors mit Ultrafiltrationsmembran eingehend untersucht. Allerdings kann es zu Membranverstopfungen und Enzymauswaschungen kommen [16].
- **Verkapselung in Hohlkugeln**

Die Enzyme werden in diesem Fall ebenfalls in nativer, gelöster Form von einer semipermeablen Membran in kugelförmigen Partikeln eingeschlossen. Eine Methode ist dabei die Herstellung der Hohlkugeln mit Hilfe von Polyelektrolyten. Dieses Verfahren wurde 1979 von Lim et al. erfunden [90;91]. Sie stellten zunächst Calciumalginatvollkugeln her, die dann in eine wässrige Lösung aus Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin gegeben wurden. Dadurch bildete sich eine Polyelektrolytkomplexmembran aus Alginat und Poly-L-Lysin bzw. Polyethylenimin. Der Calciumalginatkern wurde mit Hilfe eines Phosphat- oder Citratpuffers wieder aufgelöst. Dieses Verfahren wurde von unterschiedlichen Arbeitsgruppen angewendet [42;90;91;136]. Eine weitere Möglichkeit ist die Herstellung von Hohlkugeln mit Polyelektrolyten und mehrwertigen Ionen wie z.B. Calciumalginathohlkugeln. Die Enzyme werden mit einer Calciumchloridlösung vermischt, welche zusätzlich eine viskositätserhöhende Komponente wie Carboxymethylcellulose oder Dextran enthält, und in eine verdünnte Natriumalginatlösung eingetropft. Damit können Hohlkugeln in nur einem Schritt hergestellt werden [7;8;19;111;150]. Eine neuere Entwicklung ist die direkte Herstellung von Hohlkugeln mit Hilfe von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen. Hierbei wird das Enzym mit einem Polyanion wie z.B. Cellulosesulfat vermischt und in eine Lösung mit Polykationen wie z.B. PDADMAC getropft. An der Grenzfläche bildet sich sofort eine Schicht aus Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen, die so lange weiterwächst, bis das Tropfeninnere an Polyanion erschöpft ist oder bis der Diffusionswiderstand so groß geworden ist, dass das Polykation die Membran nicht mehr durchdringen kann. Diese Art der Hohlkugeln wurde eingehend von Dautzenberg et al. untersucht und ist Gegenstand dieser Arbeit. Daher wird diese Methode im Folgenden genauer beschrieben.
- **Membranabtrennung mit flüssigen Membranen:** Die Biokatalysatoren werden in dieser Methode mittels Phaseneinhüllung immobilisiert oder in „reversen Micellen“ eingeschlossen. Für die Phaseneinhüllung wird der in Wasser gelöste Biokatalysator in einer organischen Phase emulgiert, so dass sich kleine, von der organischen

Phase umgebende Wassertropfen mit Biokatalysator bilden. Diese können durch Tenside stabilisiert werden und auch wieder in eine wässrige Phase überführt werden. Vorteile dieser Mikroemulsionen sind vor allem bei Biokatalysatoren mit hydrophoben Substraten gegeben, nachteilig kann sich allerdings eine mögliche Inaktivierung der Biokatalysatoren durch die organische Phase auswirken [116].

#### **2.5.2.2 Matriceinhüllung**

Bei diesem Verfahren werden die Biokatalysatoren in eine Matrix mit einer gelartigen Struktur eingebettet, die einen Zutritt von Substraten und das Austreten der gebildeten Produkte zulässt. Die Matrix besteht aus synthetischen oder natürlichen Polymeren. Natürliche Polymere, die besonders schonend sind und am häufigsten verwendet werden, sind vor allem Alginat, Agar, Pektin, Carrageenan und Chitosan. Sie haben häufig den Nachteil der geringen Stabilität und der biologischen Abbaubarkeit. Demgegenüber besitzen synthetische Polymere wie Polyurethanen oder Polyvinylalkohol (PVAL) eine wesentlich bessere mechanische Stabilität. Der direkte Einschluß von Enzymen ist allerdings aufgrund des grobmaschigen Netzwerkes ungeeignet. Sie sollten vorher durch kovalente Bindung oder Ausflockung quervernetzt und damit vergrößert werden. Dies wurde bereits erfolgreich von Capan 2004 [18], Jahnz 2001 [59] und Czickocki 2001 [22] praktiziert, in dem das molekulargewichtsvergrößerte Enzym in PVAL-Linsen eingeschlossen wurde.

#### **2.5.2.3 Verkapselung in Polyelektrolythohlkugeln**

**Polyelektrolytkomplexe:** Ein Polyelektrolyt-Komplex ist nach Dautzenberg et al. (1989) [24] ein Komplex, der aufgrund Coulombscher Wechselwirkungen aus Polyanionen und Polykationen gebildet wird. Zusätzlich zählen nach Philipp et al. (1982) [126] zu den „Polyelektrolyt-Komplexen im engeren Sinne“ -auch als Symplexe bezeichnet- Komplexe, die durch überwiegend ionische Wechselwirkungen zwischen makromolekularen Anionen und makromolekularen Kationen erhaltenen Reaktionsprodukte, während zu den „Polyelektrolyt-Komplexen im weiteren Sinne“ auch die Wechselwirkungsprodukte zwischen einem Polyion und einem ungeladenen Polymer bzw. zwischen einem Polyion und einem mehrwertigen Gegenion gehören.

Die Bildung von Polyelektrolyt-Komplexen, die für die Herstellung von Polyelektrolythohlkugeln notwendig sind, beruht auf unterschiedlichen Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol- und ionische Kräfte oder van der Waals-Kräfte [25;126;131].

Bei den im Folgenden näher betrachteten Komplexen aus zwei entgegengesetzt geladenen Polyionen (Symplexen) überwiegt die ionische Wechselwirkung [24]. Nach Dautzenberg et al. 1994 [25] erfolgt die Bildung des Symplexes entsprechend dem in Abbildung 2-13

dargestellten Schema. Zunächst wird bei geringer Polymerzugabe ein ziemlich kleines, oberflächenladungsstabilisiertes Primär aggregat gebildet, das ungefähr bis 1.000 Polymerketten enthält. Bei erhöhter Polymerzugabe entstehen dann gewöhnlich größere Aggregate oder Partikel, welche eine beträchtliche Menge der Primäraggregate enthalten. Diese zweite Aggregation führt zumeist zu einer Phasenseparation, der Ausflockung [136].

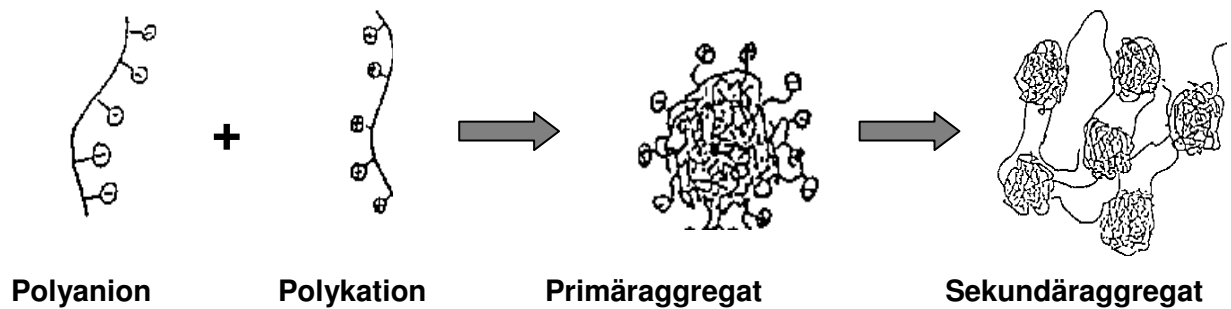


Abbildung 2-13: Zweistufenmodell der Symplexbildung [25;136]

Die Struktur der gebildeten Symplexe kann durch die zwei in Abbildung 2-14 dargestellten Grenzstrukturmodelle beschrieben werden, der „Leiterstruktur“ (Abbildung 2-14 a) und der „Röhrestruktur“ (Abbildung 2-14 b). Die reale Struktur der Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexe liegt dabei zwischen den zwei Grenzstrukturen, häufig jedoch wesentlich näher an der Röhrestruktur [25;106;126].

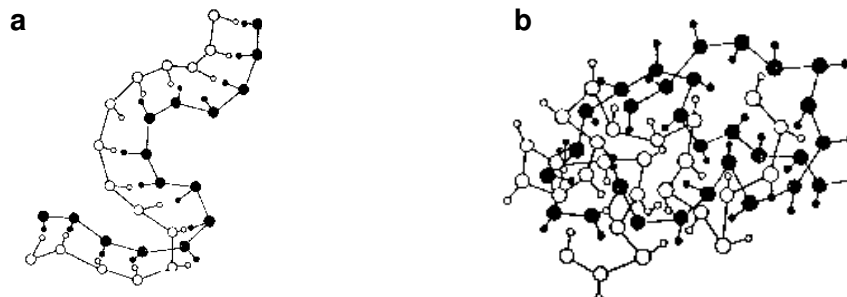


Abbildung 2-14: Schematische Darstellung von Leiter- und Röhrestruktur von Symplexen [25;106;126;136]

Die dabei entstandenen wasserunlöslichen, häufig hochgequollenen Komplexe besitzen ein hohes Wasserrückhaltevermögen, das sich je nach Art der Polymere, Ladungsdichte, Länge der nicht-ionischen Segmente der Polyelektrolyte etc. zwischen 50 und 1000 % des Gewichtes des trockenen Symplexes bewegt. Manche der Polyelektrolytkomplexe lassen sich durch die Einwirkung von Salzsäure, Natronlauge oder Salzen wieder auflösen. Ob es

dadurch zum Auflösen kommt, hängt unter anderem von der Konzentration der ionisationsfähigen Gruppen, von dem Molekulargewichtsunterschied der beiden Polymere, von dem Vorhandensein von Alkalihalogeniden und vom Umsatzgrad der eingesetzten Polyelektrolyte ab [62;126;161]. Allerdings lassen sich noch keine allgemeingültigen Aussagen zum Löslichkeitsverhalten von Simplexen machen [126].

**Hohlkugeln aus Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen:** Aus den oben beschriebenen Simplexen lassen sich Hohlkugeln herstellen, die aufgrund ihres flüssigen inneren Kerns wodurch es zu keinem Eingriff in die Struktur der Biomoleküle und der Zellen kommt, sehr interessant sind [25;26;28;29;31;139] (siehe unten).

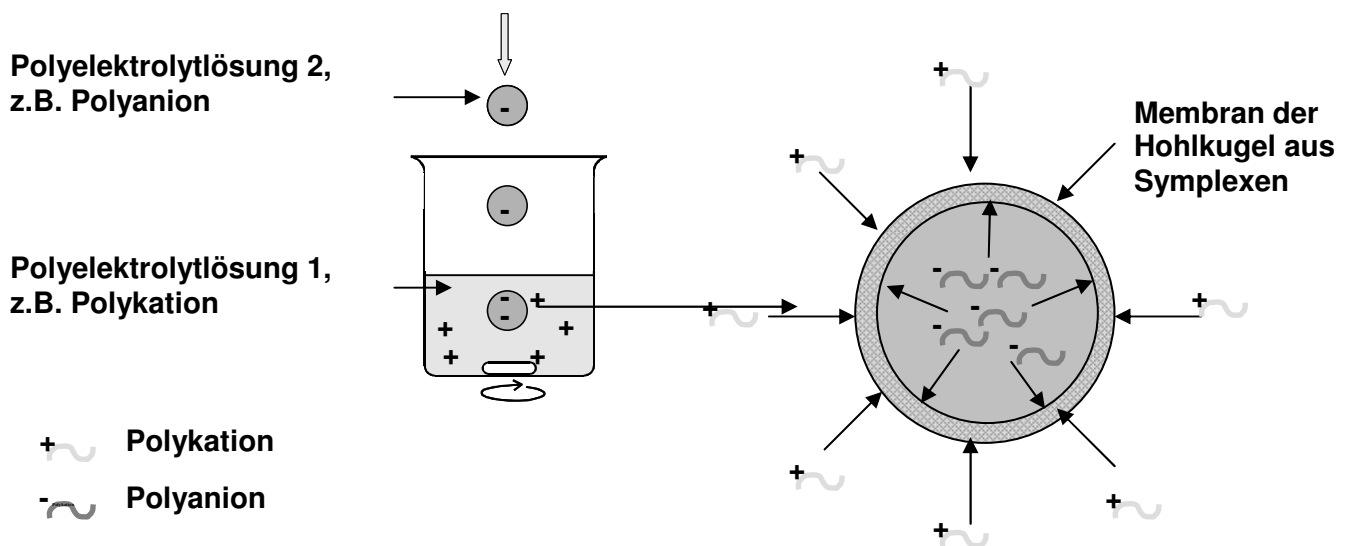


Abbildung 2-15: Entstehung von Hohlkugeln aus Polyelektrolyten

Die Entstehung dieser Hohlkugeln ist in Abbildung 2-15 dargestellt. Die Polyelektrolytlösung 2 wird mit dem zu verkapselnden Material vermischt und unter Rühren in die Polyelektrolytlösung 1 getropft. Die Polyelektrolyte diffundieren aufgrund der elektrostatischen Anziehungskraft an den Tropfenrand und bilden dort spontan eine dünne Membran aus Simplexen. Diese wächst solange an, bis die Polyelektrolyte nicht mehr in der Lage sind, die Membran zu passieren, entweder durch den zu groß gewordenen Diffusionswiderstand oder durch zu kleine Poren in der Membran oder bis es zu einer Verarmung des Polyelektrolyten im Tropfeninneren kommt (siehe auch Kapitel 2.5.2.1).

Die Besonderheit dieser Hohlkugeln sind die Biokompatibilität der Verkapselungsmaterialien, der flüssige innere Kern, die einfache Herstellung in nur einem Schritt und die semipermeable Membran. Letzteres ist dadurch gekennzeichnet, dass durch

unterschiedliche Parameter die Porengröße für verschiedene Funktionen unterschiedlich eingestellt werden kann. Damit können die Hohlkugeln je nach Bedarf als Immunbarriere bei der Einpflanzung künstlicher Zellen dienen [30], es können freie Enzyme ohne Auswaschung verkapselt werden [30], die Antikörperproduktion durch Hybridomazellen wird durch Rückhaltung der Antikörper in der Kugel erleichtert oder es können gezielt vorher verkapselten Substanzen freigesetzt werden (Medizin und Landwirtschaft) [136].

Eingesetzt werden die Hohlkugeln vor allem im medizinischen Bereich zur Verkapselung von tierischen/humanen Zellen und von Wirkstoffen zur gezielten Freisetzung in einem definierten Zeitraum. So konnten z.B. erfolgreich Pancreaszellen zur Diabetesbekämpfung verkapselt und in einen anderen Organismus (Ratten) eingebracht werden, ohne dass diese abgestoßen wurden [42;88-92].

Weitere Anwendungsgebiete sind die Biotechnologie zur Verkapselung von Enzymen und empfindlichen Zellsystemen wie tierischen Zellen, um kostspielige Wirkstoffe (z.B. Pharmazeutika oder Antikörper) herzustellen und die Landwirtschaft, um gezielt Schädlingsbekämpfungsmittel auszubringen. Einige Beispiele sind in Tabelle 2-6 aufgelistet.

Weitere mögliche Polyelektrolyte sind laut Dautzenberg et al. 1987, 1983 [28;29]:

**Polyanionen:** sulfat- oder carboxylathaltige Polysaccharide oder Polysaccharid-Derivate als Natriumsalz wie: Dextransulfat, Stärkesulfat, Celluloseacetatsulfat, Carboxymethylcellulose-sulfat oder Alginat.

**Polykationen:** Polykationen mit quartären Ammoniumgruppen wie PDADMAC oder Polyvinylbenzyltrimethylammoniumchlorid.

Die in dieser Arbeit verwendeten Polyelektrolyte sind PDADMAC als Polykation und Cellulosesulfat als Polyanion. Diese Art der Hohlkugeln wurde vor allem von Dautzenberg et al. entwickelt und gehört zu den bisher verbreitesten Hohlkugeln auf Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Basis. Erste Untersuchungen erfolgten bereits 1983, wo Cytochrom, Lebermikrosomen, Hämoglobin, Urease verkapselt wurden (siehe auch Tabelle 2-6). Die dort gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass diese Hohlkugeln prinzipiell für die Verkapselung von komplexen, cofaktorabhängigen Enzymsystem geeignet sind [128]. Die konkreten Bedingungen sind allerdings im Einzelfall zu überprüfen und damit Gegenstand dieser Arbeit.

Tabelle 2-6: Unterschiedliche Anwendungen von Polyelektrolythohlkugeln

| Verkapseltes Material   | Polyanion               | Polykation        | Anwendung  | Jahr         | Ref.       |
|---|-------------------------|-------------------|--|--------------|------------|
| Rattenzellen  | Alginat                 | Poly-Lysin        | Verkapselung von tierischen Zellen als künstliche Bauchspeicheldrüse   | 1980<br>1985 | [42;92]    |
| Cytochrom, Lebermikrosomen, Hämoglobin, Urease  | CS                      | PDADMAC           | Erste Untersuchungen von Hohlkugeln aus CS und PDADMAC   | 1983         | [128]      |
| Peptid- und Proteohormone, Hämoglobincyanid, Proteine   | CS                      | PDADMAC           | Untersuchung zur gezielten Freisetzung von Wirkstoffen   | 1986         | [44]       |
| Hybridoma Zellen  | Carboxymethylcellulose  | Chitosan          | Kultivierung von tierischen Zellen   | 1990         | [177]      |
| Lactat Dehydrogenase  | CS                      | PDADMAC           | Modelenzym für Massentransfer in den Hohlkugeln  | 1991         | [153]      |
| Invertase   | CS                      | PDADMAC           | Sucrose Hydrolyse  | 1991         | [98]       |
| Hybridoma Zellen  | CS                      | PDADMAC           | Kultivierung von tierischen Zellen   | 1991         | [104]      |
| Hybridoma Zellen  | CS                      | PDADMAC           | Produktion von Antikörpern   | 1992         | [49]       |
| Lebermikrosomen   | CS                      | PDADMAC           | Medizinische Anwendung: Detoxifikation bei Hepatitis   | 1993         | [151]      |
| Yarrowia lipolytica   | CS                      | PDADMAC           | Produktion von Citrat  | 1994         | [40]       |
| Serrata marcescens  | CS                      | PDADMAC           | Produktion von 2-Keto-Gluconsäure  | 1996         | [40]       |
| Enzyme und Zellen   | k. A.                   | k. A.             | Multilayer-Polyelektrolythohlkugeln, zur Vereinigung von def. Porengröße, Lagerstabilität, Biokompatibilität und mechanischer Stabilität | 1998         | [129]      |
| Insektenzellen  | CS                      | PDADMAC           | Produktion von Viruseinschlußkörpern eines Baculovirus   | 1998         | [54]       |
| Nebenschilddrüsenzellen   | CS                      | PDADMAC           | Künstliche Zellen  | 2001         | [162]      |
| Algen zur Schwermetallsorption  | CS/ Sulfoethylcellulose | Polyethylenimin   | Umwelttechnik, Schwermetallsorption  | 2001         | [172]      |
| nematophager Pilz Hirsutella rhossiliensis  | Sulfoethylcellulose     | PDADMAC, Chitosan | Biologische Bekämpfung des Zuckerrüben nematoden Heterodera schachtii  | 2001         | [121; 139] |
| Lipase  | Polystyren-sulfonat     | PDADMAC           | Modelenzym für Verkapselung von Hydrolasen   | 2003         | [178]      |
| Medizinische Wirkstoffe wie Asperin, Penicillin, Gramocidin, Insulin, Chymotrypsin, Lactoferrin | Gellan                  | Chitosan          | Gezielte Freisetzung von Wirkstoffen   | 2004         | [112]      |

Laut Dautzenberg et al. [27-32] sind folgende Bedingungen für Polyelektrolytkugeln aus CS/PDADMAC günstig, um stabile Kapseln zu erzeugen:

- CS:
  - Substitutionsgrad: 0,3 - 2,5, am besten 0,3-0,6
  - Viskosität: 100 - 10.000 mPas
  - Molmasse: 50 000 - 200 000
  - Konzentration: 1 - 10 %
- PDADMAC:
  - Konzentration: 0,5 - 10 %
  - Molmasse: 20 000 – 40 000
- Verhältnis der Viskosität zwischen PDADMAC und CS: 1:10 - 1:100
- Einsatz der Polyelektrolyte als Salz
- pH-Wert: 5 - 9
- Eintropfhöhe: 5 - 20 cm

Je nach Beschaffenheit der Polyelektrolyte und des zu verkapselnden Materials sind diese Bedingungen im Einzelfall zu testen.

#### Verwendete Polyelektrolyte:

**Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC):** PDADMAC ist ein lineares und sehr starkes Polykation mit positiv geladenen, quaternären Ammoniumresten (siehe Abbildung 2-16). Es wird aus dem Monomer Diallyldimethylammonium, welches durch die zweifache Alkylierung des preiswerten Dimethylamin mit Allylchlorid in wässriger alkalischer Lösung entsteht, mit Hilfe einer radikalischen Polymerisation gebildet [25]. Es wird technisch in großem Maßstab hergestellt und dient in der Wasseraufbereitung und Abwasserbehandlung als Flockungsmittel, um z.B. Kaolin, Mikroalgen, Humussäuren, Öl, Cellulosefasern, Lanthanide, Actinide und unter Zusatz von Aluminiumnitrat ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ) auch Farbstoffe aus dem Abwasser zu entfernen [136]. Darüber hinaus wird PDADMAC, wie auch in dieser Arbeit, als Polykation zur Bildung von Polyelektrolyt-Komplexen für Gele, Membranen und Kapseln verwendet.

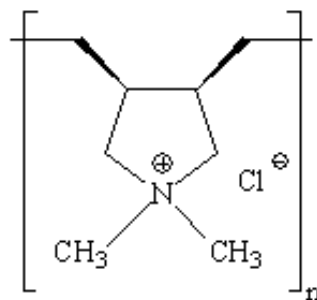


Abbildung 2-16: Struktur von Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC)

**Natrium-Cellulosesulfat:** Natriumcellulosesulfat ist ein anionischer, ebenfalls linearer Polyelektrolyt, welcher aus sulfatierter Cellulose besteht, bei der die Alkoholgruppe eines Zuckermomers durch eine anionisch wirkende Sulfatgruppe substituiert wird (siehe Abbildung 2-17). Je nach Substituierungsgrad können unterschiedlich viele Alkoholgruppen ersetzt worden sein.

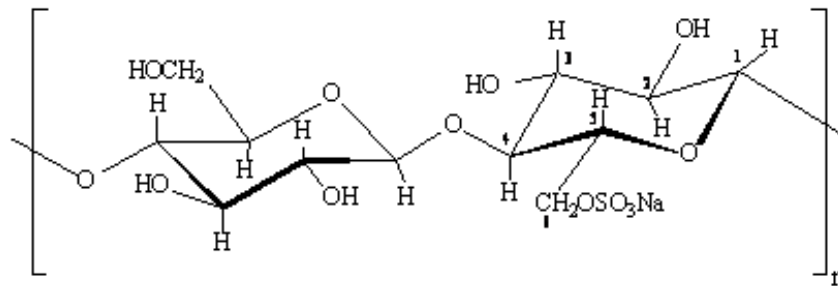


Abbildung 2-17: Struktur von Natriumcellulosesulfat

Die Herstellung von Natrium-Cellulosesulfat kann prinzipiell in heterogenen und homogenen Verfahren erfolgen. Bei homogenen Verfahren wird von Cellulose in löslichem Zustand ausgegangen, in dem beide Reaktanden - Cellulose und Sulfatierungsmittel - im Herstellungsprozeß flüssig vorliegen. Diese Methode ist jedoch aufwendig und an den Einsatz von aggressiven und/oder toxischen Reagenzien gekoppelt [95]. In heterogener Verfahrensweise wird die unbehandelte Cellulose als Feststoff eingesetzt und mit einer flüssigen Komponente sulfatiert. Dieses Verfahren hat jedoch oft einen Kettenlängenabbau der Cellulose zur Folge und die Substituentenverteilung ist relativ inhomogen [95]. Die Sulfatierungskomponente ist meistens ein Gemisch aus Schwefelsäure und Isopropanol. Eine Verbesserung des heterogenen Verfahrens haben Dautzenberg et al. [95] entwickelt.

Eingesetzt wird Cellulosesulfat hauptsächlich in der Herstellung von Membranen oder Hohlkugeln aus Polyelektrolytkomplexen. Günstig sind ein hohes Molekulargewicht und ein geringer Substituierungsgrad bei gleichzeitiger Wasserlöslichkeit.

Im Vergleich zu PDADMAC ist Cellulosesulfat teilweise biologisch abbaubar, was die Haltbarkeit begrenzt. Weiterhin ist die Ladung der Sulfatgruppen und damit die Ladung des Gesamtmoleküls pH-abhängig.



## 2.6 Immobilisierung von Zellen

Die Zellen werden ohne vorherige Aufreinigung der Enzyme als ganze, entweder lebende oder abgestorbene Zellen, immobilisiert. Diese Methode ist älter als die Immobilisierung von isolierten Enzymen und wurde 1823 erstmalig bei der Gewinnung von Essigsäure durch an Holzspäne adsorbierte Acetobacterzellen angewendet (siehe Kapitel 2.5) Vorteile sind [16]:

- keine Aufwendungen für die Aufreinigung und Isolierung von Enzymen
- Multienzymreaktionen einfacher
- komplexe Reaktionen mit zum Beispiel intrazellulärer, nativer Cofaktorregenerierung einfacher
- Schutz der Enzyme vor Scherkräften, eventuell auch vor toxischen Substanzen
- Einfache, günstige und schonende Immobilisierung durch Einschlußverfahren in Gelmatrices aus natürlichen und synthetischen Polymeren ohne Molekulargewichtsvergrößerung möglich

Speziell bei der Verwendung von lebenden Zellen ist auch die Gewinnung von Produkten des (eventuell wachstumsgekoppelten) Sekundärstoffwechsels möglich. Allerdings hat die Verwendung von lebenden Zellen den Nachteil, dass durch die Vermehrung der Zellen im Immobilisat eine Stofftransporthemmung für Produkte und Substrate auftritt. Gerade bei aeroben Mikroorganismen kann die Sauerstofflimitierung ein Problem werden [16].

Weitere Nachteile gegenüber immobilisierten Enzymen sind [16]:

- Mögliche Nebenreaktionen
- Verunreinigungen durch lysierte Zellen oder Spuren toxisch wirkender Metabolite
- In der Regel sehr viel geringere Enzymaktivitäten
- In der Regel größerer Diffusionswiderstand

Eine wichtige Rolle spielt die Immobilisierung auch bei Pflanzen –und Säugerzellen wie z.B. Gewebezellen, welche nicht isoliert lebensfähig sind, und in der Abwasserreinigung.

Im Gegensatz zu der Entwicklung von Enzymimmobilisaten wurde die Immobilisierung von Zellen erst ab ca. 1970 intensiver weiterentwickelt. So lag die Zahl der Veröffentlichungen 1973 erst bei 7 und stieg 1981 auf über 100. Erste industrielle Prozesse mit der Produktion von L-Äpfelsäure und L-Asparaginsäure wurden von Chibata realisiert [164]. Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist auch die anaerobe Herstellung von Ethanol aus Hefen. Hier konnte die spezifische Bildungsrate von Ethanol sogar um 40-50 % gesteigert werden [16].

Die Methoden der Immobilisierung von Zellen entsprechen weitestgehend denen der Enzymimmobilisierung. Angewendet werden allerdings hauptsächlich die Einschlußimmobilisierung, die Adsorption und die Ausflockung von Zellen [16]. Daher wird im Folgenden speziell auf diese Methoden eingegangen.

## **2.6.1 Immobilisierungsmethoden von Zellen**

### **2.6.1.1 Ausflockung**

Diese Methode, bei der die Mikroorganismen, häufig durch die Zugaben von mehrwertigen Ionen oder Polyelektrolyten begünstigt, größere Aggregaten bilden, wird hauptsächlich in der Abwasserreinigung zur Schlammflockung angewendet. Aber auch in der Ethanolgewinnung wird diese Methode erfolgreich mit *Saccharomyces cerevisiae* in kontinuierlichen Verfahren wie Turm- und Rohrreaktoren eingesetzt. Die Flockulierung von Mikroorganismen gilt zwar als eines der einfachsten Immobilisierungsverfahren, häufig ergeben sich aber Probleme in der Betriebsstabilität der Biokatalysatoren [16].

### **2.6.1.2 Adsorption/Adhäsion**

Die Adhäsion und die Adsorption bzw. das Aufwachsen der Zellen auf einen Träger ist ein in Natur weit verbreitetes Phänomen. Die Zellen werden durch physikalische (elektrostatisch, Van-der-Waals-Kräfte, Dipol-Dipol) Wechselwirkungen (Adsorption) oder durch die zusätzliche Bildung eines extrazellulären Sekundärmetaboliten, welcher die Haftung begünstigt (Adhäsion, z.B. bei schleimbildenden Bakterien), an einen festen Träger gebunden [16]. In der Natur sind die Träger häufig Holz, Sand, Zähne oder Schichtmineralien. In der technischen Anwendung werden oft kostengünstige Träger wie Aktivkohle, Tropfkörper, Sand, Glas oder Bimsstein eingesetzt. Nach der Anhaftung der Zellen kann es durch weiteren Aufwuchs der Zellen zur Ausbildung eines Biofilmes mit sehr hoher Stabilität kommen. Bevorzugt werden poröse Trägermaterialien aufgrund ihrer größeren spezifischen Oberfläche genommen, da damit eine höhere Dichte an aktiver Biomasse erreicht wird. Auch diese Immobilisierung findet gerne in der Abwasserreinigung und in der Umwelttechnik wie in dem Betrieb von Biofiltern –und Wäschern und dem Schadstoffsabbau Verwendung. Nachteile sind die relativ geringen Bindungskräfte, welche das Risiko des Auswaschen der Zellen, vor allem in Rührkesseln, bergen und die unterschiedlichen Bedingungen im Innen -und im Außenbereich des Biofilmes [16].

### **2.6.1.3 Einschluss von Zellen**

Die unterschiedlichen Einschlußverfahren sind denen in Abschnitt 2.5.2 erläuterten ähnlich, es gehören dazu 1. die Membranabtrennung, wo Hohlkugeln und Membranreaktoren hinzugezählt werden und 2. der Einschluß in polymere Netzwerke, bei der die Zellen in eine Gelmatrix eingebettet werden. Der Membranreaktor wird hauptsächlich zur Enzymrückhaltung verwendet (siehe 2.5.2.1). Die Hohlkugeln werden gerne für die Verkapselung von empfindlichen Zellen wie tierischen und pflanzlichen Zellen sowie künstlichen Zellen in der Medizin eingesetzt (siehe auch Kapitel 2.5.2.1 und 2.5.2.3 sowie Tabelle 2-6).

Eines der Haupteinschlußverfahren für Zellen ist jedoch die Matrixeinhüllung [71]. Dies liegt an der einfachen Handhabung des Verfahrens, den kostengünstigen Trägermaterialien und den schonenden Immobilisierungsbedingungen. Eines der ersten Verfahren hierbei ist die Immobilisierung von Zellen in Polyacrylamid-Gele von Mosbach 1966 [108]. Zur Herstellung der Gelmatrix gibt es unterschiedliche Methoden [71;164]:

- **Fällung von Polymeren aus organischen Lösemitteln:** Diese Methode, bei der das Einschlußverfahren auf der Fällung des Polymeres durch organische Lösemittel stattfindet, wird aufgrund der toxischen Effekte kaum eingesetzt. Möglich ist die Anwendung dieser Methode eventuell bei der Immobilisierung von toten Zellen mit einer einfachen Enzymreaktion [71;164].
- **Gelbildung durch Temperaturänderung:** in dieser relativ einfachen und schonenden Einschlußmethode erfahren die verwendeten Trägergele durch eine Temperaturänderung einen Phasenübergang (fest <-> flüssig). Dabei werden Gele wie Agar, Gelatine, Agarose, oder Collagen durch Erhitzen verflüssigt, leicht abgekühlt, mit den Zellen vermischt und in eine Pufferlösung getropft (bei der Herstellung sphärischer Immobilisate), in der sie abgekühlt werden und dadurch eine feste Struktur bekommen [164]. Nachteil sind die häufig sehr weichen, mechanisch instabilen Gele [71]. Auch Immobilisate aus PVAL, einem synthetischen Polymer, welches Immobilisate mit sehr guter mechanischer Stabilität ergibt, können auf diese Art hergestellt werden. Die Immobilisate müssen dabei auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt werden, damit sich eine feste Struktur des PVAL's bildet. Danach folgt ein langsames Wiederauftauen auf Raumtemperatur. Ein mehrmaliges Wiederholen dieser als „freeze and thawing“ bekannten Methode stabilisiert die Struktur. Neuerdings können Immobilisate aus PVAL jedoch auch durch eine kontrollierte Trocknung hergestellt werden [60]. Diese Immobilisate sind fester und mechanisch sehr stabil.
- **Polykondensation/Polymerisation:** Bei der Polykondensation werden bifunktionelle oligomere Präpolymere mit einer geeigneten multifunktionellen Komponente zu chemisch und mechanisch stabilen Netzwerken umgesetzt. Zu diesen Immobilisaten gehören jene aus Polyurethan, PEI-Glutardialdehyd, Collagen und Gelatine jeweils mit Glutardialdehyd oder PEI-Acrolein. Bei der Polymerisation werden geeignete Monomere, Oligomere oder Polymere mit di –oder multifunktionellen Monomeren copolymerisiert. Hierzu gehören Immobilisate aus Polyacrylamid [108] sowie Polymere aus aktiviertem PEG oder aus mit Acrylsäure verestertem PVAL. Problematisch sind dieser Immobilisierungsmethode vor allem die mögliche Toxizität der Edukte und die Reaktionsbedingungen, die sich negativ auf die Aktivität des

Biokatalysators auswirken können. Dies gilt vor allem für Produkte mit Polymerisation aus Monomeren [16;71;164].

- **Ionotrope Gelbildung:** Die ionotrope Gelbildung ist das am häufigsten angewendete Einschlußverfahren von Zellen. Es werden dabei wasserlösliche Polykationen/ Polyanionen mit –meist mehrwertigen- Kationen/Anionen (in manchen Fällen auch mit entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten) zu festen Polymernetzwerken, deren Struktur in der Hauptsache auf ionischen Wechselwirkungen beruhen, vernetzt. Als Polykationen/Polyanionen kommen z.B. Polysaccharide mit funktionellen Gruppen (Carbonat-, Phosphat-, Sulfat- oder Aminogruppe) wie Alginat, Carrageenan, Pektin, Carboxymethylcellulose, Cellulosesulfat oder Chitosan in Frage. Die Gegenionen sind üblicherweise entweder mehrwertige, möglichst untoxische Kationen wie  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{K}^+$  oder mehrwertige, ebenfalls möglichst untoxische Anionen wie Polyphosphate. Vorteile sind die besonders schonenden Reaktionsbedingungen, die preiswerten, nicht-toxischen und lebensmittelrechtlich unbedenklichen Materialien, bei denen auch empfindliche Mikroorganismen ihre Aktivität behalten und die einfache Herstellung [71;164].

#### 2.6.1.4 Geleinschluß in Calciumalginat

**Eigenschaften der Alginat:** Alginat sind Polysaccharid-Derivate, genauer Salze der Polyuronsäuren, die als Strukturkomponente in den Zellwänden aller Braunalgen (Phaeophyta) vorkommen und großtechnisch aus den großwüchsigen Algen der Ordnungen Laminariales und Fucales (speziell die Gattungen *Laminaria*, *Macrocystis*, *Lessonia*, *Ecklonia*, *Ascophyllum*, *Fucus* und *Durvillaea*) gewonnen werden [99]. Alginat setzt sich aus den Monomeren  $\beta$ -D-Mannuronat und  $\alpha$ -L-Guluronat (siehe Abbildung 2-18) zusammen. Diese sind linear über 1,4-glykosidische Bindungen verknüpft.

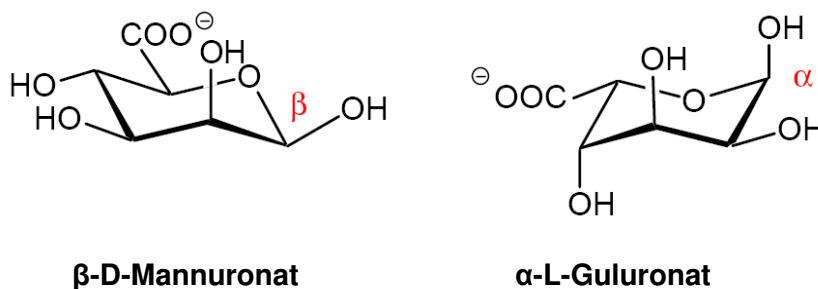


Abbildung 2-18: Monomere des Alginates:  $\beta$ -D-Mannuronat und  $\alpha$ -L-Guluronat ( aus [99])

Dabei unterscheidet man 3 verschiedene Block-Typen, aus denen die Alginat bestehen können (siehe Abbildung 2-19):

1. MM-Block: Polymerblock aus  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften D-Mannuronat-Resten
2. GG-Block: Polymerblock aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften L-Guluronat-Resten
3. GM-Block: alternierender Polymerblock aus beiden Monomeren

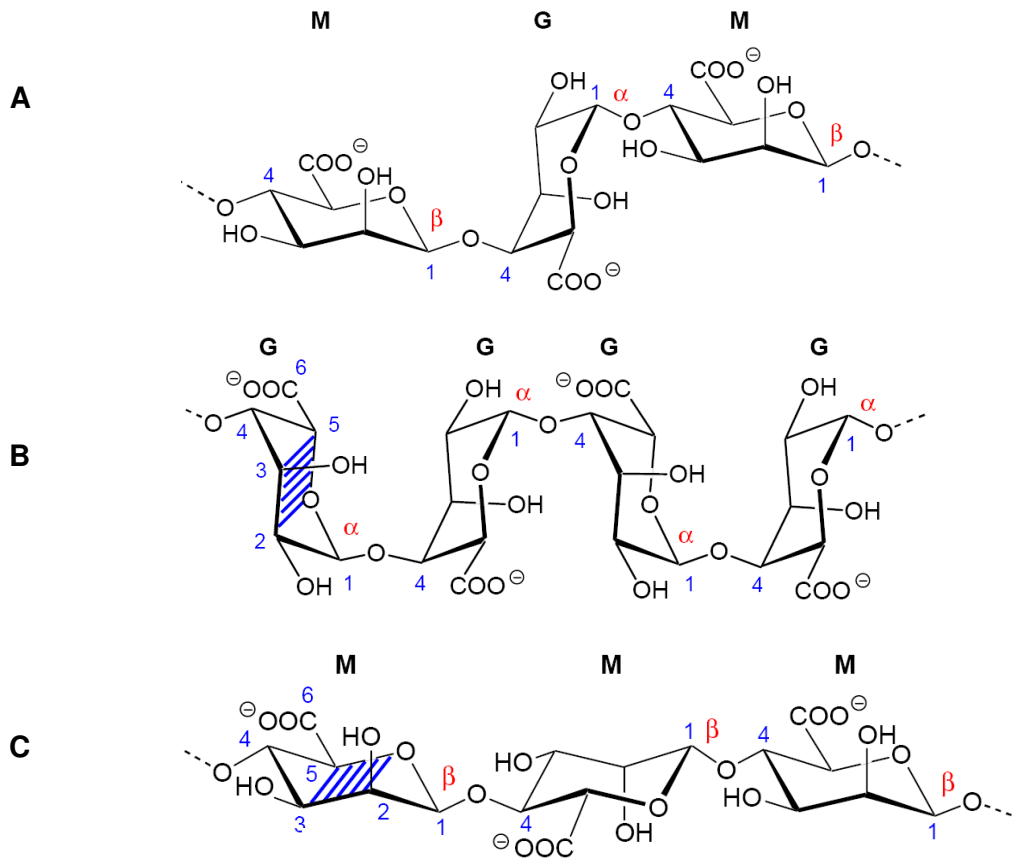


Abbildung 2-19: unterschiedliche Blocktypen des Alginats (aus [99]):  
A) GM-Block, B) GG-Block, C) MM-Block

Die Molekülmassen von Alginaten liegen je nach Polymerisierungsgrad im Bereich von etwa 20.000 bis 600.000 Da [99;115]. Der Anteil an GG-, MM- und GM-Blöcken variiert in der Braunalge je nach Braunalgen-Spezies und dem morphologischen Bereich der Pflanze, welchem das Polysaccharid entstammt und hängt auch von der geographischen Herkunft der Alge, ihrem Reifegrad sowie von saisonalen Bedingungen ab [99;131]. Je nach Anteil und Verhältnis dieser Blöcke in dem Alginat ändern sich deren Eigenschaften. So sind für die Gelbildung nur die GG-Blöcke verantwortlich. Damit entstehen aus Alginaten mit vielen GG-Blöcken festere und auch brüchigere Gele (siehe unten).

Alginat sind nicht toxisch und werden als gesundheitlich unbedenklich eingestuft. Sie werden neben der hier beschriebenen Immobilisierungsmethode vor allem in der Lebensmittelindustrie, in der Medizin, in der Kosmetikindustrie sowie in der Farbmittel- und

Papierindustrie, dem Textildruck und in der Wasseraufbereitung zur Gelbildung und als Stabilisierungs- und Verdickungsmittel eingesetzt [99].

**Gelbildung von Alginaten:** Neben der säurekatalysierten Gelbildung der Alginsäure ist die ionotrope Gelbildung der Polyuronatsalze mit Calcium die am häufigsten angewendete Gelierungsmethode und wurde vor allem von Rees et al. [131] untersucht. Für die Gelbildung sind die GG-Blöcke im Alginat verantwortlich. Diese können mit dem 2-wertigen Kation durch Wechselwirkung mit den Sauerstoffatomen der Guluronate zu Chelat-Komplexen assoziieren (siehe Abbildung 2-20). Jedes Calciumion wird dabei von genau 4 Guluronatresten koordinativ gebunden. Zur Gelbildung werden Polyguluronatkettenlängen von mindestens 20 Monomeren benötigt [99]. Es bildet sich dann eine Gelstruktur aus, welche von Rees et al. 1977 [131] als „Eierkarton-Modell“ bezeichnet wird (siehe Abbildung 2-20)

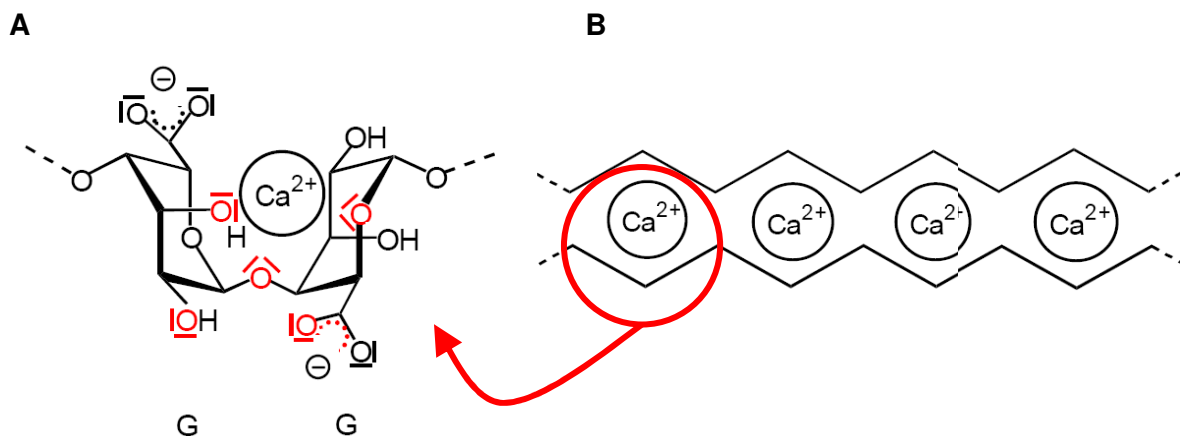


Abbildung 2-20: ionotrope Gelbildung bei Alginat (aus [99]):  
 A) Bindung des Calciums innerhalb eines GG-Dimers  
 B) daraus resultierende Eierkartonstruktur

Die Polymannuronat- und die alternierenden Sequenzen reagieren nicht mit den Calcium-Ionen, sondern bilden die Maschen des Gelnetzwerkes, in welche Wasser eingelagert werden kann [45;99]. Alginat mit vielen GG-Blöcken bilden daher druckfestere, aber brüchigere Gele als Alginat mit mehr MM- oder GM-Blöcken. Dessen Gele sind nicht so druckstabil, aber dafür flexibler [164].

**Immobilisate aus Alginat:** Immobilisate aus Calciumalginat wurden als erstes von Kierstan et al. 1977 für Zellen angewendet [71]. Sie werden durch das Eintropfen eines Biokatalysator/Alginat-Gemisches in eine Calcium-Ionen enthaltende Lösung hergestellt. An der Phasengrenzfläche bildet sich zunächst eine Membran aus einem Calciumalginatgel, welche, je weiter die Calciumionen in den Tropfen hineindiffundieren, immer stärker in das Innere des Tropfens hineinwächst, bis sich eine voll durchgelierete Gelkugel gebildet hat. Die

Eigenschaften dieser Immobilisate hängen unter anderem von Eigenschaften wie der Zusammensetzung der Alginat in Bezug auf ihren Guluronatanteil oder ihr Molekulargewicht ab. So führt ein hoher Gehalt an Guluronat zu stabileren Immobilisaten [149;164]. Die Porengröße der Gelkugeln liegt im Bereich von 5 bis 200 nm [99;149], so dass immobilisierte Zellen nur in geringen Maße ausgewaschen werden und hohe Beladungen möglich sind [164], aber trotzdem eine gute Diffusion der Substrate und Produkte gewährleistet ist [99;149]. Weitere Vorteile dieser Immobilisate sind:

- Kostengünstiges Immobilisierungsmaterial
- Gute Biokompatibilität des Materials, so dass auch empfindliche Zellen ohne große Aktivitätsverluste eingeschlossen werden können
- Keine Thermoreversibilität der Gele bei Temperaturen im Bereich von 0-100 °C
- Einfache Herstellungsmethode
- Gute Handhabung der Immobilisate

Nachteilig wirken sich folgende Faktoren aus:

- Chemische Instabilität: durch das Vorhandensein von Anionen wie Phosphat oder Citrat, welche mit Calcium Komplexe bilden können, können diese das Calcium aus der Gelmatrix herauslösen und damit das Gel destabilisieren bzw. auflösen. Auch durch hohe Konzentrationen an anderen Kationen, die nicht gelbildend wirken, wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , können die Gelkugeln stark aufquellen bzw. sich auflösen [149;164;165]. Dabei hat sich gezeigt, dass Gele mit einem hohen Gehalt an Guluronat eine größere Toleranz gegenüber hohen Kationenkonzentrationen haben als Gele mit einem niedrigen Gehalt. Entgegenwirken kann man dieser Instabilität durch die Zugabe von Calcium in das Medium. Das Verhältnis von Calcium zu Kationen wie Natrium sollte bei Alginaten mit einem hohen Guluronat-Gehalt nicht kleiner als 20:1 und bei Alginaten mit einem niedrigen Guluronat-Gehalt nicht kleiner als 3:1 sein [101;165].
- Biologische Abbaubarkeit, was zu einer sterilen Arbeitsweise zwingen kann
- Depolymerisation bei Hitzebehandlung wie Autoklavieren, durch saure Hydrolyse bei pH-Werten unter 5 und  $\beta$ -alkoxy-Elimination bei pH-Werten über 10.

#### 2.6.1.5 Geleinschluß in $\kappa$ -Carrageenan

**Eigenschaften der Carrageenane:** Carrageenane sind ebenfalls Polysaccharidderivate, welche aus linear-angeordneten, 1,4- $\beta$ - und 1,3- $\alpha$ -glykosidisch verknüpften  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Galaktosederivaten besteht. Sie werden aus den Zellwänden von Rotalgen (*Rhodophyta*), hauptsächlich großwüchsigen Gattungen wie *Chondrus*, *Gigartina*, *Iridaea*, *Eucheuma* oder *Hypnea*, gewonnen [99]. Das Molekulargewicht liegt bei einem Polymerisierungsgrad von 400-4000 zwischen 100.000–1.000.000 Da [99]. Je nach Struktur und Galaktosederivat lassen sich die Carrageenane in 3 Hauptgruppen einteilen:

- $\kappa$ -Carrageenan
- $\lambda$ -Carrageenan und
- $\iota$ -Carrageenan

Die Zusammensetzung der Carrageenane in den Algen ist abhängig von der Algenart, ihren geographischen Vorkommen sowie der Erntezeit.  $\iota$ -Carrageenan und  $\kappa$ -Carrageenan bilden sich auch während der Carrageenangewinnung aus den Algen in Abhängigkeit der gewählten Extraktionsmethode.

Zur ionotropen Gelierung sind nur  $\iota$ -Carrageenan und  $\kappa$ -Carrageenan verwendbar [99], wobei sich am besten  $\kappa$ -Carrageenan zur Gelbildung eignet [71;164]. Es besteht aus den Monomeren  $\alpha$ -D-3,6-Anhydrogalactose und  $\beta$ -D-Galactose-4-sulfat, welche jeweils 1,4- $\beta$ - und  $\alpha$ -1,3-glykosidisch miteinander verknüpft sind (siehe Abbildung 2-21).

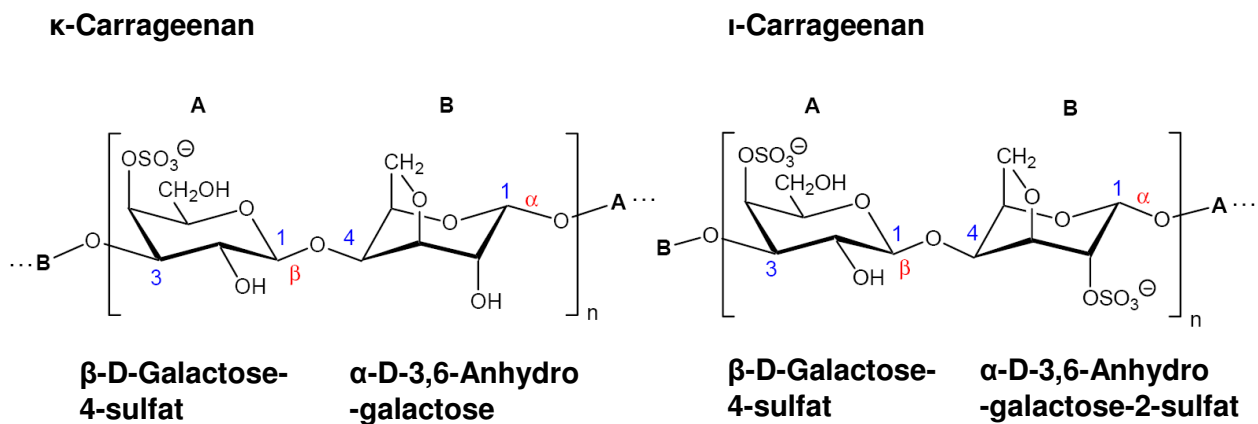


Abbildung 2-21: Struktur von  $\kappa$ -Carrageenan und  $\iota$ -Carrageenan (aus [99])

Hochmolekulare Carrageenane mit Molmassen größer als 100.000 g/mol sind wie Alginat nicht toxisch und als gesundheitlich unbedenklich eingestuft. Sie werden vor allem in der Lebensmittelindustrie, aber auch in der Kosmetik- und Pharmaindustrie als Verdickungs- und Stabilisierungsmittel sowie als Gelierungsmittel verwendet.

**Gelbildung von Carrageenanen:** Wie oben erwähnt, sind nur  $\iota$ -Carrageenan und  $\kappa$ -Carrageenan zur ionotropen Gelierung verwendbar, da nur in diesen Carrageenantypen das Monomer  $\alpha$ -D-3,6-Anhydrogalactose bzw. dessen sulfatiertes Derivat vorliegt. Die Anhydrobrücke bewirkt, dass die glykosidischen Verknüpfungen diäquatorial vorliegen, was die Voraussetzung der Bildung von Doppelhelices und damit der Bildung von festen Gelen ist [99;107]. Die Gelbildung ist in Abbildung 2-22 dargestellt.

Wird Carrageenan auf ca. 70-80 °C erhitzt, liegt es gelöst als statistisches Knäuel vor. Bei Abkühlung kommt es zur Bildung von helixartigen Strukturen, den Doppelhelices. Durch die



Zugabe von Kaliumionen, welche sich zwischen die Spiralen einlagern können, werden die Doppelhelices stabilisiert. Durch die Einlagerung hydratisierter Kationen geeigneter Größe wie  $K^+$ ,  $NH_4^+$  oder  $Ca^{2+}$ -Ionen zwischen die Helixstrukturen bilden sich größere, feste Aggregate, ein Gel [13;99;131;164]. Dabei ergeben sich je nach Gegenion unterschiedlich feste Gele. Eine Übersicht hierfür ist bei Chibata et al. 1987 [21] zu finden. Die Temperatur, auf die das Carrageenan für eine Gelbildung abgekühlt werden muss, hängt von der Menge an vorhandenen Kalium- und Calcium-Ionen im Carrageenan ab. Je höher diese Menge, desto höher ist die Gelierungstemperatur [50;164].  $\kappa$ -Carrageenan bildet festere Gele als  $\iota$ -Carrageenan, da die  $\alpha$ -D-3,6-Anhydro-galactose nicht sulfatisiert ist. Damit hat  $\kappa$ -Carrageenan eine geringere Ladungsdichte, was die Aggregation der Doppelhelicestränge durch Kalium oder Calcium fördert, da die Abstoßung der Doppelhelicestränge verringert ist. Auch die sterische Hinderung der Doppelhelicebildung durch die sulfatisierte  $\alpha$ -D-3,6-Anhydro-galactose bei  $\iota$ -Carrageenan ist nicht vorhanden [13].

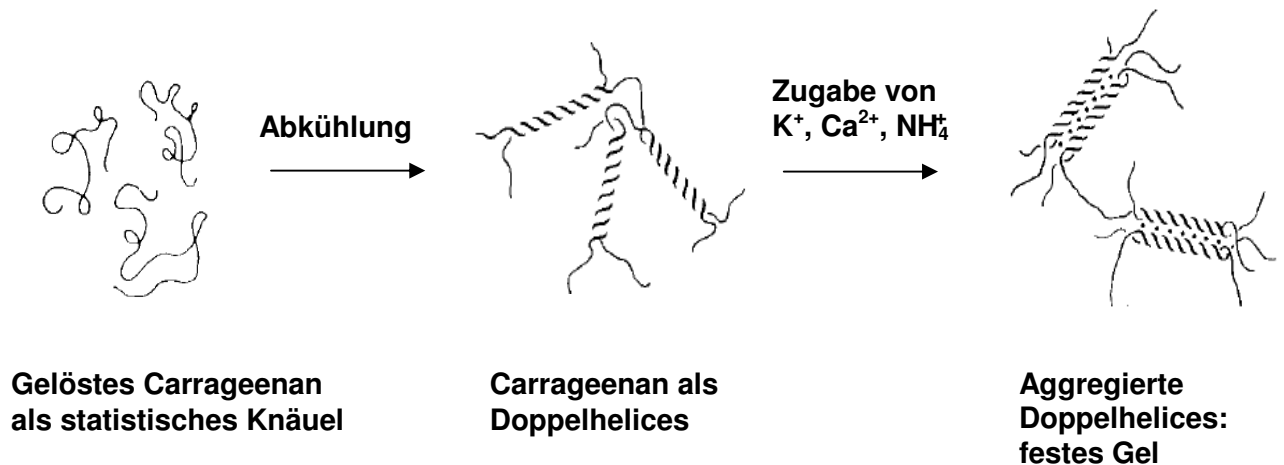


Abbildung 2-22: Gelbildung bei Carrageenan (aus [99])

**Immobilisate aus Carrageenan:** Als erstes wurde  $\kappa$ -Carrageenan von Chibata et al. 1977 als Immobilisierungsmatrix genutzt [71]. Die Immobilisate werden, wie auch die Immobilisate aus Alginat, durch das Eintropfen eines Biokatalysator/Carrageenan-Gemisches in eine Calcium-Ionen enthaltende Lösung hergestellt. Nach einer Gelierungszeit von 15 min werden sie jedoch zum Austausch der Calciumionen durch Kaliumionen in eine Kalium-Chlorid-Lösung gegeben.

Vorteile der Carrageenan-Immobilisate sind:

- Kostengünstiges Immobilisierungsmaterial
- Gute Biokompatibilität des Materials
- Einfache Herstellungsmethode
- Gute Handhabung der Immobilisate
- Uneingeschränkte Verwendbarkeit in Kaliumphosphat- oder Citratpuffer

- Keine Destabilisierung, sondern Stabilisierung durch hohe Salzkonzentrationen wie Kalium oder Ammonium
- keine Depolymerisation bei Hitzebehandlung wie Autoklavieren

Nachteilig können folgende Faktoren sein:

- Thermoreversibilität: eine Temperaturerhöhung um etwa 5 – 10 °C über die ursprüngliche Geliertemperatur kann eine Auflösung der Immobilisate zur Folge haben
- Biologische Abbaubarkeit, was zu einer sterilen Arbeitsweise zwingen kann
- Waschen der Zellen vor Mischen mit Carrageenanlösung notwendig, da vorhandene, gelbildende Kationen eine sofortige Gelbildung bewirken können.

## **2.7 Beispiele der Immobilisierung von FDH und LeuDH**

Die Immobilisierung der FDH und der LeuDH als cofaktorregenerierendes System zur Produktion von L-*tert*-Leucin wurde bisher in nur wenigen Veröffentlichungen beschrieben. Gegenstand waren darin 2 unterschiedliche Methoden, bei der beide Enzyme, die LeuDH und FDH, gemeinsam parallelimmobilisiert wurden:

- **Enzymmembranreaktor:** Der Enzymmembranreaktor wurde, wie in Abschnitt 2.5.2.1 und 2.3.4 beschrieben, am Forschungsinstitut in Jülich entwickelt und dort auf unterschiedliche Enzymsysteme, unter anderem auch auf die LeuDH und die FDH zur Produktion von L-*tert*-Leucin angewendet. Eine genaue Untersuchung dazu hat Kragl et al. 1992 [75] durchgeführt. Die freien Enzyme werden dabei in einem kontinuierlich durchflossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe einer Ultrafiltrationsmembran, die für Produkte und Substrate durchlässig ist, zurückgehalten. Dieses Verfahren wird von der Degussa bereits industriell zur Produktion von L-*tert*-Leucin angewendet [175]. Um auch den Cofaktor NAD zurückzuhalten, wurde dieser von Bückmann et al. 1981 [17] an das Polymer PEG gekoppelt, sodaß dieser molekulargewichtsvergrößerte Cofaktor die Ultrafiltrationsmembran des Enzym-Membranreaktors nicht mehr passieren konnte.
- **Polymer-Gele:** 1987 wurden beide Enzyme von Kajiwar et al. [63] mit Hilfe einer Gefriertrocknungsmethode zusammen mit verschiedenen Enzymstabilisatoren in ein Polymergel eingeschlossen. Dieses Gel bestand aus PEG(4000)-Diacrylat, N,N'-Methylenbisacrylamid und 2-Hydroxyethylacrylat, die in einem organischem Lösemittel gelöst waren und nach Vermischung mit den Enzymen polymerisiert wurden. Der entstandene Gelblock wurde vor der Benutzung zerschnitten und gewaschen. Allerdings ging 17,5 % (LeuDH) bzw. 27,5 % (FDH) der Enzyme in die Waschflüssigkeit verloren und die Restaktivität der eingeschlossenen Enzyme betrug

nur 37% (FDH) bzw. 22% (LeuDH) der eingesetzten Aktivität. Dies und die Tatsache, dass recht toxische Produkte zur Polymerisierung eingesetzt werden müssen, sind große Nachteile dieser Methode.

Da die FDH aufgrund ihrer Eigenschaften gerne als cofaktorregenerierendes Enzym verwendet wird, wurde mit verschiedenen Methoden versucht, dieses Enzym zu immobilisieren.

- Kovalente Quervernetzung der FDH mit bifunktionalen Reagenzien wie Dianhydriden und N-Hydroxysuccinimidestern (NHS) [155;156]: es konnte zwar die thermische Stabilität der FDH durch die Immobilisierung verbessert werden, allerdings hatte die FDH durch den Immobilisierungsvorgang über 30 % Aktivität verloren und die intermolekulare Quervernetzung war unzureichend. Auch wären die Immobilisierungsreagenzien in einem technischen Prozess zu teuer.
- 2007 wurde von Bolivar et al. [9] ebenfalls auf unterschiedliche Weise versucht, die FDH zu immobilisieren. Die FDH wurde einerseits kovalent an verschiedene, mit funktionellen Reagenzien aktivierte Träger gebunden. Die Prozessstabilität konnte zwar gegenüber dem löslichen Enzym erhöht werden, es ergaben sich jedoch unbefriedigende Restaktivitäten. Durch die Bindung an Anionentauscher wie PEI-, MANAE- und DEAE-Agarose wurden zwar gute Restaktivitäten erzielt, allerdings konnte die FDH durch hohe Salzkonzentrationen wieder desorbiert werden.

Insgesamt liegen keine Kenntnisse über eine zufrieden stellende Immobilisierungsmethode für die FDH sowie für das FDH/LeuDH-System vor.

### 3 EXPERIMENTELLER TEIL

#### 3.1 Analytik

##### 3.1.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten

###### 3.1.1.1 Formiatdehydrogenase

**Messbedingungen:**

|                        |            |
|------------------------|------------|
| Temperatur:            | 30 °       |
| pH-Wert:               | 8,2        |
| c (NaFormiat):         | 0,4 mol/l  |
| c (NAD <sup>+</sup> ): | 2 mmol/l   |
| c (KPi-Puffer):        | 0,05 mol/l |

**Eigenschaften der Formiatdehydrogenase** (zur Verfügung gestellt vom Industriepartner):

|                       |                                 |
|-----------------------|---------------------------------|
| Wirtsorganismus:      | <i>Candida boidinii</i>         |
| spez. Enzymaktivität: | 3,3 U/mg                        |
| vol. Enzymaktivität:  | 90 U/ml                         |
| Proteingehalt:        | 27 mg/ml                        |
| Lagerung:             | in 50 %igem Glycerin bei -20 °C |

Da die Formiatdehydrogenase bei der Lagerung bei 4 °C ihre spezifische Aktivität verliert sowie ihre  $K_m$ -Werte sich ändern, wurde sie bei -20 °C gelagert.

###### 3.1.1.2 Leucindehydrogenase

**Messbedingungen:**

|                         |            |
|-------------------------|------------|
| Temperatur:             | 30 °C      |
| pH-Wert:                | 8,2        |
| c (TMP):                | 0,15 mol/l |
| c (NH <sub>4</sub> Cl): | 0,4 mol/l  |
| c (NADH):               | 0,1 mmol/l |
| c (KPi-Puffer):         | 0,05 mol/l |

**Eigenschaften der Leucindehydrogenase** (zur Verfügung gestellt vom Industriepartner):

|                      |                                 |
|----------------------|---------------------------------|
| Wirtsorganismus:     | <i>Bacillus cereus</i>          |
| vol. Enzymaktivität: | 470 U/ml                        |
| Lagerung:            | in 50 %igem Glycerin bei -20 °C |

### 3.1.1.3 Messung der Enzymaktivität der freien Enzyme

Die Bestimmung der Aktivitäten der freien FDH und der freien LeuDH wurden nach Protokollen von Degussa modifiziert durchgeführt (FDH-Protokoll: QM-AV/SC-FEFC-1-002/02, LeuDH-Protokoll: QM-AV/SC-FE-FC-1-001/02).

Die Aktivität wurde jeweils in online-Küvettentests gemessen, indem die Zunahme/Abnahme an gebildetem/verbrauchtem NADH bei 340 nm photometrisch verfolgt wurde. Die Berechnung erfolgte mittels Formel 3-1:

$$EA[U / ml] = \frac{V_{gesamt} * VF}{d * V_{probe} * \epsilon} * \frac{\Delta E}{\min}$$

|                |   |
|----------------|---|
| $V_{gesamt}$ : | Gesamtvolumen in der Küvette/Probegefäß [ $\mu$ l]            |
| $V_{probe}$ :  | Volumen der zugegebenen Enzymmenge [ $\mu$ l]                 |
| $VF$ :         | Verdünnungsfaktor   |
| $\epsilon$ :   | Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm:<br>6,22 1/(mM*cm) |
| $\Delta E$ :   | Extinktionsänderung bei 340 nm                                |
| $d$ :          | Schichtdicke der Küvette [cm]                                 |

---

Formel 3-1: Berechnung der Enzymaktivität

Für die Messung der Enzymaktivität der LeuDH wurden UV-durchlässige Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 0,5 cm verwendet. Das Gesamtvolumen betrug 1,5 ml. Die Enzymaktivität der FDH wurde in Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Das Gesamtvolumen betrug dabei 1 ml. Der Verdünnungsfaktor und das Volumen der zugegebenen Enzymmenge variierten je nach Probe. Die Substratlösungen der FDH bzw. der LeuDH (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.2) wurden jeweils auf 30 °C vorgewärmt, um für alle Enzyme gleiche Reaktionstemperaturen zu garantieren. Die Reaktionen wurden mit Zugabe des jeweiligen Enzyms gestartet. Enzymlösung und Substratlösung in der Küvette wurden mit Parafilm abgedichtet, durch mehrmaliges Schwenken gemischt und die Messung bei 340 nm am UV/VIS-Photometer anschließend sofort gestartet. Wurden zu steile oder zu flache Steigungen der Extinktionszunahme gemessen, wurden die betroffenen Enzymlösungen verdünnter, konzentrierter oder in größerer Menge eingesetzt.

### 3.1.1.4 Messung der Enzymaktivität von mit Glutaraldehyd und Chitosan quervernetzter Formiatdehydrogenase und ausgeflocktem Enzym

Da durch die makroskopisch sichtbaren Flocken in diesem Fall keine online Küvettest möglich waren, wurde die quervernetzte Formiatdehydrogenase außerhalb des Photometers bei 30 °C inkubiert. Dazu wurden mehrere Schnappdeckelgläschen, welche 10 ml der Substratlösung aus Kapitel 3.1.1.1 enthielten und mittels eines Magnetrührers in einem

30 °C-Wasserbad gerührt wurden. Nach Erwärmen der Substratlösung auf 30 °C wurde die Messung durch die Zugabe des quervernetzten Enzyms gestartet und nach definierten Zeitintervallen je 1 ml Proben gezogen. Diese wurden auf 4 °C gekühlt, um die Reaktion zu unterbrechen, in der Eppendorfszentrifuge bei 4 °C und 13000 rpm 5 min abzentrifugiert und der NADH-Gehalt im Überstand per Extinktionsmessung bei 340 nm im Photometer gemessen. Die Enzymaktivität wurde gemäß Formel 3-1 berechnet. Zur Kontrolle wurde auch freie, unbehandelte Formiatdehydrogenase mit einer definierten Enzymmenge mit gemessen. Die gemessene Enzymaktivität der immobilisierten FDH (Suspension) wurde als Restaktivität [%] gemäß Formel 3-2 (3) berechnet.

1

$$\text{Rest}EA_{\text{über}} [\%] = \frac{EA_{\text{über}} \left[ \frac{U}{ml} \right] * V_{\text{Ansatz}} [ml]}{EA_{\text{eingesetzt}} [U]} * 100$$

2

$$\text{Rest}EA_{\text{immo}} [\%] = \frac{EA_{\text{immo}} [U]}{EA_{\text{eingesetzt}} [U]} * 100$$

3

$$\text{Rest}EA_{\text{sus}} [\%] = \frac{EA_{\text{sus}} \left[ \frac{U}{ml} \right] * V_{\text{Ansatz}} [ml]}{EA_{\text{eingesetzt}} [U]} * 100$$

$EA_{\text{immo}}$ : Enzymaktivität im Immobilisat  
 $EA_{\text{eingesetzt}}$ : eingesetzte Enzymaktivität  
 $EA_{\text{sus}}$ : Enzymaktivität in der Suspension  
 $EA_{\text{über}}$ : Enzymaktivität im Überstand

Formel 3-2. Berechnung der Restaktivität

### 3.1.1.5 Messung der Enzymaktivität von verkapseltem und von ausgeflocktem Enzym

Da sich auch hier das Enzym in makroskopisch sichtbaren Immobilisaten befindet, wurden die Immobilisate zur Enzymaktivitätsmessung außerhalb des Photometers in einem doppelwandigen Glasgefäß mit Hilfe eines Thermostaten bei 30 °C temperiert. Die Polyelektrolytkapseln wurden, um sie nicht zu zerschneiden, mit Hilfe eines Scheibenrührers gerührt. Dieser wurde aus einer hohlen Metallstange hergestellt, welche am unteren Ende zusammengedrückt wurde, so dass eine ca. 1,5 \* 1,5 cm große Rührfläche entstand. Die Substratlösung (s. Kapitel 3.1.1.1 bzw. 3.1.1.2) - V=30 ml - wurde auf 30 °C erwärmt und die Reaktion durch die Zugabe einer definierten Menge an verkapselten bzw. ausgeflocktem Enzym gestartet. In 1-minütigen Abständen wurde eine Probe gezogen, im Photometer sofort in einer Einmalküvette die Extinktion bei 340 nm bestimmt und die Extinktionsänderung pro Zeit aufgetragen. Die Probe wurde mit einer 1 ml-Eppendorf Pipette gezogen, welche auf der Pipettenspitze einen Perlonstrumpf besaß, so dass die Messung im Photometer nicht durch Immobilisat verfälscht wurde. Um das Reaktionsvolumen nicht zu ändern, wurden die Proben nach der Extinktionsmessung wieder vollständig zurückgegeben. Die Enzymaktivität wurde nach Formel 3-1 bestimmt. Eine Beispielmessung ist in Abbildung

3-1 gezeigt. Die gemessene Enzymaktivität der immobilisierten FDH wurde als Restaktivität [%] im Vergleich zur unbehandelten, freien FDH angegeben.

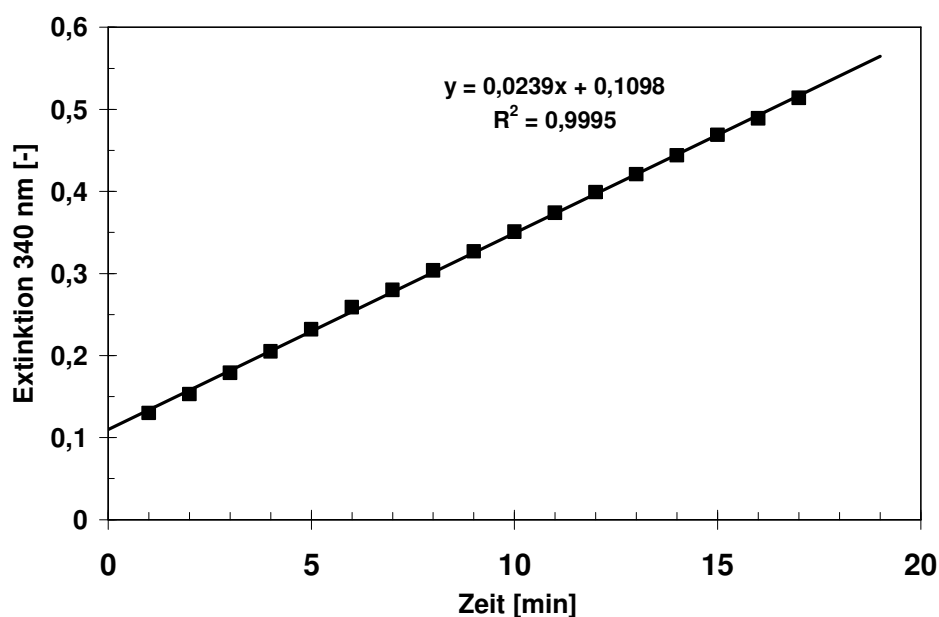


Abbildung 3-1: Beispielmessung der Enzymaktivität von verkapselter Formiatdehydrogenase

#### 3.1.1.6 Messung der Aktivität der parallelverkapselten Enzyme LeuDH und FDH

Die Aktivität von Polyelektrolytkapseln, in die beide Enzyme verkapselt wurden, wurde ebenfalls in einem durch einen Thermostaten temperierbaren, doppelwandigen Glasgefäß gemessen und mit Hilfe des oben (Kapitel 3.1.1.5) beschriebenen Scheibenrührers gerührt. Nachdem die Reaktionslösung (s. u.) auf 30 °C erwärmt wurde, wurde die Reaktion durch die Zugabe eines abgewogenen, definierten Aliquots an Polyelektrolytkapseln, welches beide Enzyme in definierten Mengen enthielten, gestartet. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben gezogen, diese in Eppendorfgefäßen in der Tischzentrifuge bei 13000 rpm und 4 °C 5 min abzentrifugiert, der Überstand mit Millipore Wasser in HPLC-vials verdünnt und in einem Wasserbad bei 80 °C 10 Minuten erhitzt, um eventuell freigesetztes Enzym zu inaktivieren. Die Substratkonzentration ( $c$  (TMP)) wurde mit Hilfe von HPLC analysiert (siehe Kapitel 3.1.2). In Vorversuchen wurde ausgeschlossen, dass sich das TMP in der unten beschriebenen Reaktionslösung in dem Wasserbad zur Inaktivierung zersetzt und damit das Ergebnis verfälschen kann. Mit Hilfe der Abnahme der Substratkonzentration pro Zeit wurde die Aktivität und die Restaktivität des Co-Immobilisates entsprechend bestimmt (s. Formel 3-3).

Reaktionslösung:

|   |        |
|---|--------|
| c (TMP):                                | 150 mM |
| c (NH <sub>4</sub> -Formiat):           | 450 mM |
| c (NADH):                               | 1 mM   |
| c (TRIZMA-Puffer):                      | 100 mM |
| pH-Wert:                                | 8,2    |
| Temperatur:                             | 30 °C  |
| Substratvolumen (V <sub>gesamt</sub> ): | 10 ml  |

|          |  |   |  |
|----------|--|---|--|
| <b>A</b> | $EA_{gesamt} [\mu\text{mol}_{TMP} / \text{min}] = \frac{\Delta c (TMP) [\mu\text{mol} / \text{l}] * V_{gesamt} [\text{l}]}{\Delta t [\text{min}]}$ | <i>EA<sub>gesamt</sub>:</i><br><i>Δc (TMP):</i> | <i>Aktivität der Gesamtreaktion</i><br><i>Abnahme von c(TMP) während Δt</i>    |
| <b>B</b> | $RestEA_{gesamt} [\%] = \frac{EA_{gesamt} [U]}{EA(LeuDH \text{ oder } FDH)_{eingesetzt} [U]} * 100$  | <i>Δt:</i><br><i>RestEA<sub>gesamt</sub>:</i>   | <i>Zeitabstand während Δc (TMP)</i><br><i>Restaktivität der Gesamtreaktion</i> |

---

Formel 3-3: Berechnung der Gesamtaktivität (A) und der Restaktivität gesamt (B)

**3.1.2 HPLC-Analytik**

Die in Enzym- oder Zellsätzen verbrauchten Mengen an Trimethylpyruvat wurden mit Hilfe einer HPLC analysiert. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurde jede Probe in einer Doppelbestimmung und mit dem internen Standard Arabinose gemessen. Der Messbereich der TMP-Konzentration in dieser Analytik befand sich zwischen 2-6 mM. Die Proben wurden gemäß Kapitel 3.1.1.6 und 3.3.7 behandelt und verdünnt und die TMP-Konzentration anhand der Peakflächen und mit Hilfe des internen Standards berechnet. Wurden die Proben nicht sofort nach der Probennahme gemessen, wurden sie bei -20 °C aufbewahrt. Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 3-2 zusehen. Detaillierte Analysendaten des HPLC-Systems sind im Folgenden aufgelistet.

**Analysendaten:**

|                 |  |
|-----------------|--|
| Säule:          | sulfonierte Divinylbenzenstyren-Copolymer Säule: Aminex HPX-87H;<br>Fa. Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Laufmittel:     | 5 mM Schwefelsäure   |
| Flussrate:      | 0,6 ml/min   |
| Ofentemperatur: | 35 °C  |
| Säulendruck:    | 70-80 bar  |



**Apparatedaten:**

|                   |                        |
|-------------------|------------------------|
| Degaser           | 4-Kanal Knauer, Berlin |
| Pumpe             | K-1001 Knauer, Berlin  |
| Autosampler       | Spark Marathon         |
| Säulenofen        | W. O. Electronic       |
| RI-Detektor       | K-2301 Knauer, Berlin  |
| Interfacebox      | Knauer, Berlin         |
| Analysensoftware: | Chromgate®             |

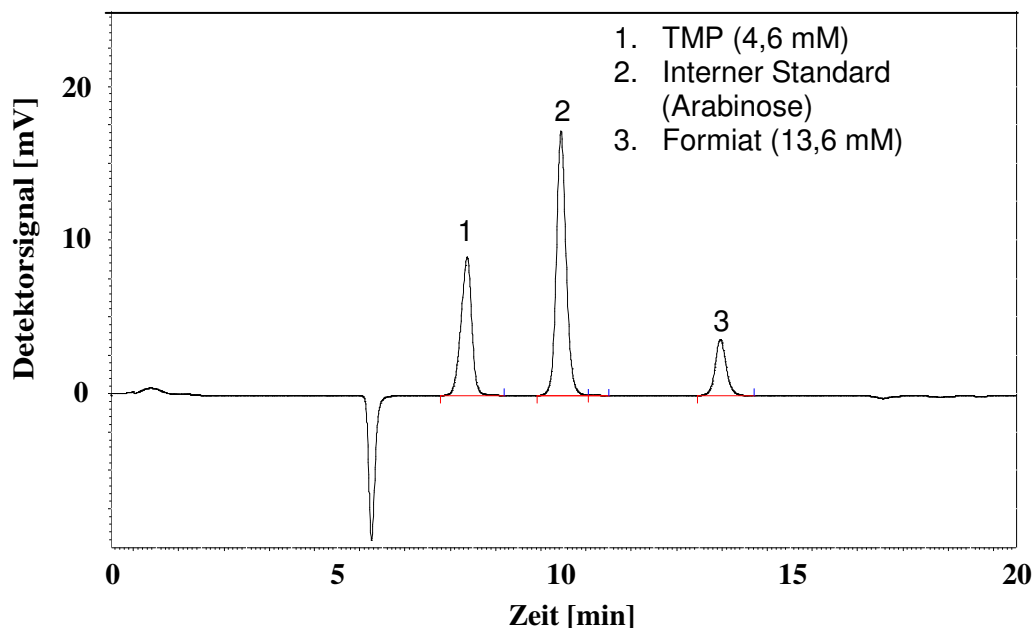


Abbildung 3-2: Beispielchromatogramm der HPLC-Messung für TMP

**3.1.3 GC-Analytik zur Bestimmung der L-tert-Leucin-Konzentration**

Um die Konzentration an gebildetem L-tert-Leucin zu messen, wurde das in den Proben vorhandene L-tert-Leucin mit Hilfe des Test-Kits EZ:faast der Firma Phenomenex aufbereitet, derivatisiert und mittels einer GC-Analytik quantifiziert. Diese Analytik ist speziell für die Analyse von Aminosäuren entwickelt worden. Die Probenvorbereitung mit Hilfe des EZ:faast Test kits besteht zunächst aus einer Festphasenextraktion der Probe, bei der spezifisch nur Aminosäuren gebunden werden und die Probe von störenden Komponenten befreit wird. Die an das Sorbens gebundenen Aminosäuren wurden in wässriger Lösung derivatisiert und schließlich in eine organische Phase extrahiert. Die in der organischen Lösung befindlichen derivatisierten Aminosäuren wurden mittels GC analysiert. Um die Genauigkeit dieser Messung zu erhöhen, wurde zu der Probe vor Beginn der Probenvorbereitung der interne Standard Norvalin, welcher von der Firma Phenomenex als Bestandteil Test-Kit EZ:faast mitgeliefert wurde, hinzugefügt und alle Messungen in Doppelbestimmung gemessen. Der

Messbereich dieser Analytik befand sich zwischen 10 und 100 mg/l, so dass entsprechende Verdünnungen der Proben hergestellt wurden. Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 3-3 zu sehen. Detaillierte Analysendaten sind im Folgenden aufgelistet.

### Detektorsignal [mV]

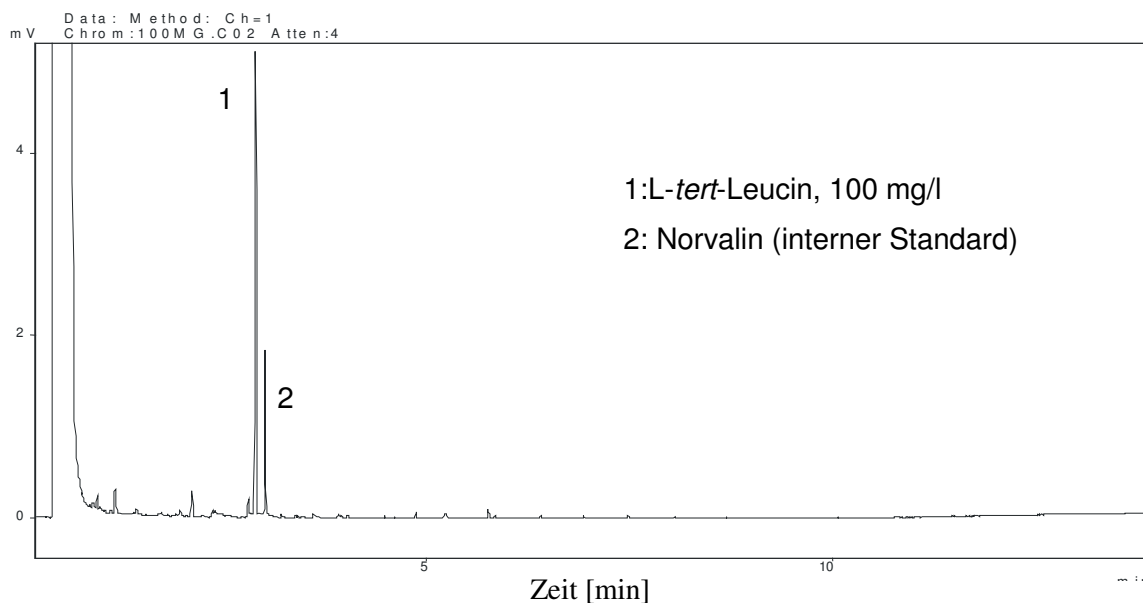


Abbildung 3-3: Beispielchromatogramm der L-tert-Leucin Analytik

### Apparatedaten:

|                   |   |
|-------------------|---|
| GC-System:        | GC-17A, Fa. Shimadzu, Duisburg  |
| Autosampler:      | AOC-1400, Fa. Shimadzu, Duisburg  |
| Autoinjektor:     | AOC-17, Fa. Shimadzu, Duisburg  |
| Detektor:         | FID   |
| GC-Säule:         | ZBAAA Zebron <sup>TM</sup> Amino Acid, 10 m * 25 mm<br>Fa. phenomenex USA                 |
| Analysensoftware: | Class-LC10, Version 1.64A (D), Shimadzu Chemical Laboratory<br>Analysis System & Software |

### Analysendaten:

|                         |                                |
|-------------------------|--------------------------------|
| Injektion:              | 2,0 µl, Split 1:15 bei 250 °C  |
| Trärgas:                | Helium, 1,5 ml/min             |
| Druckprogramm:          | 3 kPa/min                      |
| Ofentemperaturprogramm: | 32 °C/min, von 110 °C – 320 °C |
| Detektortemperatur:     | 320 °C                         |
| Analysenzeit:           | 15 min                         |

### 3.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die spezifische Enzymaktivität der Enzymstammlösungen zu bestimmen, wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Bradfordtests [14] bestimmt. Dazu wurde ein Bradfordreagenz der Fa. Sigma-Aldrich benutzt und die Proteinkonzentration gemäß der dort enthaltenen Anleitung in 3-facher Bestimmung gemessen. Eine Kalibriergerade wurde mit Hilfe von fertigen Proteinstandards aus Rinderserumalbumin der Konzentration 2 mg/ml erstellt.

## 3.2 Immobilisierungsmethoden

### 3.2.1 Herstellung von Polyelektrolythohlkugeln

Die Polyelektrolythohlkugeln zur Verkapselung der Enzyme wurden mit den Polyelektrolytlösungen Cellulosesulfat und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) der Firma biorefinery, Potsdam, hergestellt. Sie wurden im gebrauchsfertigen Zustand geliefert und enthielten 2,4 bzw 5 % Cellulosesulfat und 4 % PDADMAC sowie jeweils 0,63 % NaCl. Da sie bei 4 °C gelagert wurden, wurden die benötigten Mengen in ein 30 ml Becherglas gefüllt und vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Danach wurde der pH-Wert mit Hilfe von HCl und NaOH entsprechend Tabelle 3-1 eingestellt. Das Cellulosesulfat wurde mit der Enzymlösung und gegebenenfalls 0,63 %iger NaCl-Lösung so vermischt, dass das Cellulosesulfat die gewünschte Enzymbeladung in [U/g<sub>CS</sub>] und die gewünschte Konzentration besaß und in den Abblaskopf der Abblasapparatur (siehe Abbildung 3-4) eingefüllt. Die gewünschte Konzentration des PDADMACs wurde ebenfalls mit 0,63 %iger NaCl-Lösung eingestellt.

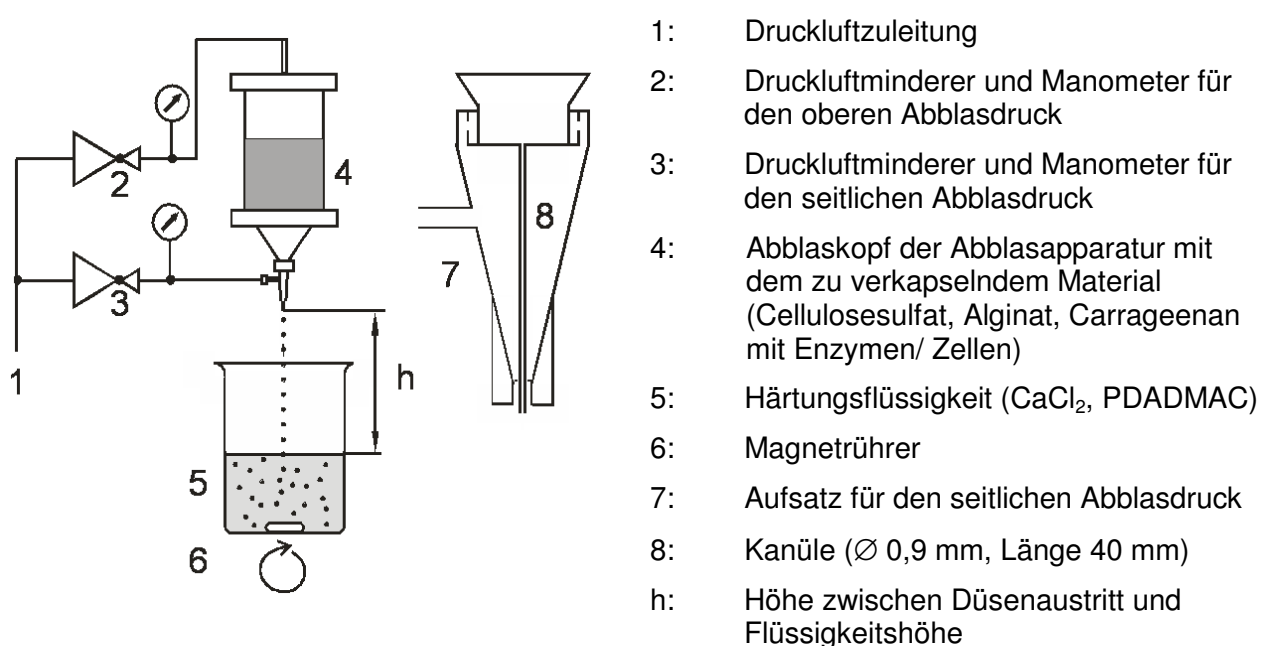


Abbildung 3-4: Abblasapparatur zur Herstellung von verkapselten Enzymen und Zellen

Das enzymladene Cellulosesulfat wurde in der Abblasapparatur mit Hilfe des seitlichen und des oberen Abblasdruckes durch die Kanüle in die PDADMAC-Lösung unter Rühren (Magnetrührer, Rührgeschwindigkeit s. Tabelle 3-1) eingetropft (siehe Abbildung 3-4). Die Größe und Form der Kugeln konnte dabei durch die Änderung des seitlichen Abblasdruckes und der Höhe  $h$  eingestellt werden. Die hierbei entstandenen Hohlkugeln wurden 10-20 min gerührt (s. Tabelle 3-1), danach mit Hilfe eines Perlonstrumpfes aus der PDADMAC-Lösung entnommen, kurz mit Millipore-Wasser abgespült, um PDADMAC-Reste zu entfernen und in Millipore-Wasser zurückgequollen, um eventuelle Schrumpfungerscheinungen rückgängig machen zu können. Die fertigen, enzymladenen Kugeln wurden mit Hilfe des Perlonstrumpfes abgenommen, in die zur Messung nötige Mengen mittels Analysenwaage aliquotiert und, falls sie nicht am selben Tag gemessen wurden, in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,2 bei 4 °C in Eppendorfgefäßen aufbewahrt.

Tabelle 3-1: Verkapselungsbedingungen der in Kapitel 5 hergestellten Polyelektrolytkapseln

| Kapitel  | 4.2.3.2.     | 4.2.3.3      | 4.2.3.4      | 4.2.3.5      | 4.3.2        | 4.4.1                   | 4.4.2,<br>pH 5,9        | 4.4.2.<br>pH 8,2        |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Beladung Immobilisat [U/g<sub>Immo</sub>]</b>   | 16           | 32           | 19,4         | 8,4          | 2,28         | 6,4(FDH)/<br>5,7(LeuDH) | 6,2(FDH)/<br>7,6(LeuDH) | 8,8(FDH)/<br>7,5(LeuDH) |
| <b>Beladung der FDH [U/g<sub>cs</sub>]</b>         | 10           | 9            | 9,4          | 9,8          | 6,13         | 8,1                     | 7,7                     | 8,2                     |
| <b>Beladung der LeuDH [U/g<sub>cs</sub>]</b>       | N/A          | N/A          | N/A          | N/A          | 10           | 6,9                     | 9,4                     | 9,4                     |
| <b><math>h</math> [cm]</b>                         | 9,5          | 9,5          | 9,5          | 9,5          | 9,5          | 9,5                     | 9,5                     | 9,5                     |
| <b>Rührgeschwindigkeit [rpm]</b>                   | 200          | 200          | 200          | 200          | 600          | 600                     | 600                     | 600                     |
| <b><math>c</math> (CS) [%]</b>                     | 2,16         | 2,16         | 2,16         | 2,16         | 2,16         | 2,16                    | 3                       | 3                       |
| <b><math>c</math> (PDADMAC) [%]</b>                | 4            | 4            | 4            | 4            | 2,4          | 2,4                     | 3                       | 3                       |
| <b>pH (CS)</b>                                     | 7,5-8,5      | 7,5-8,5      | 7,5-8,5      | 7,5-8,5      | 7,5-8,5      | 7,5-8,5                 | 5,9                     | 8,2                     |
| <b>pH (PDADMAC)</b>                                | 7,5-8,5      | 7,5-8,5      | 7,5-8,5      | 7,5-8,5      | 7,5-8,5      | 7,5-8,5                 | 6                       | 8,2                     |
| <b>Eintropfzeit [min]</b>                          | 1            | 2            | 1            | 1            | 1            | 1                       | 1                       | 1                       |
| <b>Vernetzungsdauer [min]</b>                      | 15           | 18           | 15           | 10           | 10           | 11                      | 17                      | 17                      |
| <b>Oberer und seitlicher Abblasdruck [bar/bar]</b> | 0,3/<br>0,15 | 0,3/<br>0,15 | 0,3/<br>0,12 | 0,1/<br>0,15 | 0,2/<br>0,17 | 0,2/<br>0,17            | 0,35/<br>0,15           | 0,35/<br>0,15           |
| <b>Durchmesser der Hohlkugeln [mm]</b>             | 0,8          | 0,9          | 0,95         | n.a.         | 1,12         | 0,95                    | 1,17                    | n.a.                    |

Die genauen Eintropfbedingungen, die in den einzelnen Versuchen in Kapitel 5 verwendet wurden, sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. Um die genaue, in den Kapseln vorhandene Menge an Enzym (Beladung Immobilisat) zu bestimmen, wurden der Abtropfkopf mit dem eingefüllten Cellulosesulfat/Enzymlösung vor und nach dem Eintropfen ausgewogen, um die eingetropfte Menge an Cellulosesulfat/Enzymlösung ermitteln zu können. Weiterhin wurde das Gewicht der Spritzverluste während des Herstellungsprozesses und die Gesamtmasse an eingetropften Kugeln bestimmt sowie die genaue, im flüssigen CS vorhandene Enzymaktivität - in Tabelle 3-1 auch Beladung der FDH bzw. LeuDH [U/g<sub>CS</sub>] genannt - gemäß Kapitel 3.1.1.1, 3.1.1.2 und 3.1.1.3 gemessen. Damit konnte nach Formel 3-4 A die in den Kapseln vorhandene Menge an Enzym - in Tabelle 3-1 auch Beladung Immobilisat [U/g<sub>Immo</sub>] genannt – bestimmt werden. Die Berechnung der Restenzymaktivität erfolgte mit der Formel 3-4 A und B.

$$\mathbf{A} \quad EA_{Kugeln \text{ eingesetzt}} [U/g] = \frac{EA_{CS} [U/g] * (m_{\text{eingetropftes CS}} [g] - m_{\text{Spritzverluste}} [g])}{m_{Kugeln \text{ gesamt}} [g]}$$

$$\mathbf{B} \quad RestEA [\%] = 100 * \frac{EA_{Kugeln \text{ gemessen}} \left[ \frac{U}{g} \right]}{EA_{Kugeln \text{ eingesetzt}} \left[ \frac{U}{g} \right]}$$

$$\begin{array}{ll} EA_{Kugeln \text{ eingesetzt}} [U/g]: & EA \text{ der eingesetzten Kugeln} = \text{Beladung Immobilisat} [U/g_{Immo}] \\ EA_{CS} [U/g]: & EA \text{ im CS} = \text{Beladung der FDH bzw. LeuDH} [U/g_{CS}] \end{array}$$

---

Formel 3-4: Bestimmung der eingesetzten Enzymaktivität (A) und der Restaktivität (B) in Polyelektrolytkugeln

### 3.2.2 Vernetzung der FDH mit Glutaraldehyd und Chitosan

Die Quervernetzung der FDH erfolgte durch Reaktion mit Glutaraldehyd und Chitosan. Das Chitosan (Chitosan "fine grade"-Produkt, Batch-No. TM578, Primex Ingredients ASA, Avaldsnes (Norwegen)) wurde in 0,5 % (w/w) Essigsäure gelöst und anschließend unter starkem Rühren durch langsame Zugabe von Natronlauge der pH-Wert auf 5,5 eingestellt, bis das Chitosan vollständig aufgelöst war.

Die Chitosanlösung wurde der FDH-Stammlösung vermischt und in diese Lösung 50 %iges Glutaraldehyd langsam unter Rühren eingetropft. Die Reaktion fand in einem Schnappdeckelgläschen mit einem Reaktionsvolumen von 4 ml statt. Die Enzymkonzentration betrug 3,5 U/ml bzw. 1 mg<sub>Protein</sub>/ml, die Chitosankonzentration 3,4 mg/ml und das Verhältnis von Protein/Chitosan 0,3 mg<sub>Protein</sub>/mg<sub>Chitosan</sub>. Diese Lösung wurde 16

Stunden bei 4°C gerührt. Um eine mögliche Inaktivierung der FDH durch diesen Rührprozess festzustellen, wurde auch eine Lösung ohne die Zugabe von Glutaraldehyd mit nur Chitosanlösung und FDH 16 Stunden bei 4 °C gerührt.

Die Enzymaktivität der FDH in der resultierenden Lösung wurde gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.4 gemessen.

### **3.2.3 Vernetzung der FDH mit voraktivierten Chitosanflocken**

Die Herstellung von voraktivierten Chitosanflocken erfolgte durch die Zugabe von 50 %iger Glutaraldehydlösung in stark verdünnte Chitosanlösung. Hierbei wurden zu 4 l 0,024 %iger Chitosanlösung (gelöst in 0,5 %iger Essigsäure, pH 6,1) mit insgesamt 0,96 g Chitosan die 10-fache Menge an Glutaraldehyd (17 ml 50 %ige Glutaraldehydlösung) langsam unter ständigem Rühren hinzuge tropft und für ungefähr 2 Stunden gerührt. Die hierbei ausgefallenen Glutaraldehyd/Chitosanflocken (voraktivierte Chitosanflocken) wurden bei 2000 U/min und 4°C für 20 min in der Becherzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Flocken in 2 \* 800 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Die Flocken wurden danach wieder bei 2000 U/min und 4°C für 20 min in der Becherzentrifuge abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ca. 4mal wiederholt. Nach jedem Waschschrift wurde der Gehalt an freiem Glutaraldehyd im Überstand mit Hilfe des Schiffschen Reagenzes purpald® der Firma Sigma-Aldrich bestimmt, bis kein Glutaraldehyd mehr nachweisbar war. Die Bestimmung des Glutaraldehyds mit Hilfe des Schiffschen Reagenz hatte eine Nachweisgrenze von 7 mg/l. Die nun von ungebundenem Glutaraldehyd befreiten voraktivierten Chitosanflocken wurden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,2 resuspendiert, mit einer entsprechenden Menge an FDH (405, 1260, 1421 und 2576 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>Immobilisat(Trockenmasse)</sub>, siehe Kapitel 4.2.1.2) und 16 Stunden bei 4°C gerührt, um die Bindung des Enzyms an die voraktivierten Chitosanflocken zu ermöglichen. Um zu überprüfen, ob die Behandlung der FDH ohne voraktivierte Chitosanflocken das Enzym schädigt, wurde parallel dazu ein Ansatz mit inkubiert, in dem sich nur Enzym und Kaliumphosphatpuffer pH 8,2 befanden. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 9-10 ml. Nach 16 h wurde 1 ml der entstandenen Flocken in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Immobilisat 3-fach mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Enzymaktivität des Immobilisat, der Suspension und des Überstandes wurde entsprechend Kapitel 3.1.1.1, 3.1.1.3 und 3.1.1.4 bestimmt und die resultierende Restaktivität gemäß Formel 4-1 berechnet. Die Trockenmassebestimmung des Immobilisates erfolgte folgendermaßen: eine definierte Menge an gut durchmischter Immobilisatsuspension wurde in vorgetrocknete, ausgewogene Falconröhrchen gegeben, der Überstand abzentrifugiert, das Immobilisat mit destilliertem Wasser gewaschen und 24 h im Trockenschrank getrocknet. Das Gewicht der verbliebenen Trockenmasse wurde auf

einer Analysenwaage bestimmt und auf die eingesetzte Immobilisatsuspension zurückgerechnet.

### 3.2.4 Ausflockung der FDH mit unterschiedlichen Flockungsmitteln

#### 3.2.4.1 Ausflockung der FDH mit kationischen Flockungsmitteln

**Vorversuche in Küvetten:** Vorversuche, durch die geeignete Flockungsbedingungen abgeschätzt werden konnten, wurden in Küvetten durchgeführt. Dazu wurden zu 1 ml Enzymlösung (1 mg<sub>Protein</sub>/ml, pH 8,1) unterschiedliche Mengen (0,004-1,25 mg<sub>Flock</sub>/mg<sub>Protein</sub>) an kationischem Flockungsmitteln (pH 8) gegeben und nach bestimmten Zeiten das Flockungsergebnis mit Hilfe einer OD-Messung bei 650 nm überprüft. Dabei ergab die höchste OD den besten Flockungserfolg. Eine Liste der verwendeten Flockungsmittel ist in Tabelle 3-2 gegeben.

Tabelle 3-2: verwendete Flockungsmittel zur Ausflockung der FDH

| Flockungsmittel      | Firma                | Chemische Zusammensetzung     | Molekulargewicht       | Ladung     |
|----------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------|------------|
| PDADMAC sigma 522376 | Sigma Aldrich        | PDADMAC                       | Sehr niedrig molekular | kationisch |
| Polymin PR8179       | BASF                 | Polyvinylamin                 | 2-2,5 Mio g/mol        | kationisch |
| Polymin PR8182       | BASF                 | Polyvinylamin                 | 2-2,5 Mio g/mol        | kationisch |
| Polymin SK           | BASF                 | modifiziertes Polyethylenimin | 1 Mio g/mol            | kationisch |
| Polymin HM           | BASF                 | modifiziertes Polyethylenimin | 2 Mio g/mol            | kationisch |
| AGEFLOC WT40         | CPS Chemical Company | PDADMAC                       | k.A.                   | kationisch |
| AGEFLOC WT50         | CPS Chemical Company | PDADMAC                       | k.A.                   | kationisch |
| Protanal LF 20/60    | FMC Biopolymer AS    | Alginat                       | k.A.                   | anionisch  |
| SEC, 4824T342        | Wolff Walsrode       | Sulfoethylcellulose           | k.A.                   | anionisch  |
| Cellulosesulfat      | Kelco                | Cellulosesulfat               | k.A.                   | anionisch  |

**Hauptversuche:** Hierbei wurde in 10 ml einer 1 mg/ml FDH-Lösung pH 8,1 portionsweise auf 0,2 – 1 % verdünnte Lösung des entsprechenden kationischen Flockungsmittels (siehe

Tabelle 3-2) hinzugegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung 10 min auf Eis gerührt (Becherglas Ø 5 cm, Rührfischlänge 2,4 cm, 200 rpm), die OD bei 650 nm bestimmt und die entstandene Suspension optisch beurteilt. Es wurde solange Flockungsmittel zugegeben, bis eine hohe OD oder große Flocken entstanden waren. 2 ml der Suspension wurden abgenommen und in der Eppendorfszentrifuge bei 6000 rpm und 4 °C 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4 °C bis zur Enzymmessung aufbewahrt. Das Waschen der Pellets erfolgte durch Resuspendieren der Pellets in Wasser oder der entsprechenden Salzlösung. Diese Suspension wurde dann bei 4 °C und 6000 rpm 15 min in der Eppendorfszentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für den nächsten Waschschrift erneut resuspendiert. Die Messung der Enzymaktivität von Suspension, Überstand und gewaschenem Pellet erfolgte gemäß Kapitel 3.1.1.1, 3.1.1.3 und 3.1.1.5 und die entsprechende Restaktivität wurde nach Formel 3-2 berechnet.

#### **3.2.4.2 Ausflockung der FDH mit kationischen und anionischen Flockungsmitteln**

Es besteht auch die Möglichkeit, die FDH zusätzlich mit Hilfe von kationischen und anionischen Flockungsmitteln auszuflocken. Dazu wurde das kationische Flockungsmittel benutzt, welches zuvor das beste Ergebnis erbracht hatte, in diesem Fall PDADMAC 522376 von Sigma-Aldrich. Es wurden zur Ausflockung der FDH zwei Methoden verwendet:

##### **1. Zugabe des anionischen Flockungsmittel vor Zugabe des kationischen Flockungsmittel:**

Dieser Versuch wurde nur in Küvettenversuchen durchgeführt. Dazu wurde verdünnte Enzymlösung (pH 8) mit geringen Mengen an anionischem Polymer (pH 8, Endkonzentration in der Küvette 1,3-75 mg/l) in einer Küvette vermischt. Danach wurden kleine Mengen an kationischem Polymer (pH 8, Endkonzentration in der Küvette 18 mg/l), PDADMAC 522376 der Firma Sigma-Aldrich, hinzugemischt. Dieses wurde 10 min inkubiert und anschließend die Trübung bei 650 nm gemessen. Die Stärke der Trübung war dabei ein Maß für den Ausflockungserfolg.

##### **2. Zugabe des kationischen Flockungsmittel vor Zugabe des anionischen Flockungsmittel:**

**Küvettenvorversuch:** Hierbei wurde zunächst verdünnte Enzymlösung (pH 8) mit einem so hohen Überschuss an kationischem Polymer PDADMAC 522376 (pH 8, Endkonzentration 500 mg/l) versetzt, dass sich noch keine Flocken bilden konnten. Danach wurde das anionische Polymer (pH 8, Endkonzentration 50-1000 mg/l) dazugemischt und nach 10 min Inkubationszeit die Trübung bei 650 nm gemessen.



**Versuch in kleinem Becherglas:** Zu einer Enzym/PDADMAC 522376-Lösung (pH 8,2, Endkonzentration Enzym 1 mg/ml, Endkonzentration PDADMAC 500 mg/l) wurde in 5 Schritten anionisches Flockungsmittel bis zu einer Endkonzentration von 500 mg/l dazugegeben. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Lösung 10 min auf Eis gerührt. Nach der letzten Zugabe wurde wieder die OD bei 650 nm gemessen, die Flocken in einer Eppendorfsentrifuge bei 13000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und die Enzymaktivität jeweils im Überstand und in der Suspension gemäß Kapitel 3.1.1 beschrieben, gemessen. Die Differenz der Enzymaktivität in der Suspension und im Überstand ergab die Enzymaktivität im Pellet. Von der gemessenen Enzymaktivität wurde jeweils die Restaktivität in % gemäß Formel 3-2 berechnet. Das Waschen der Pellets erfolgte durch Resuspendieren der Pellets in Wasser oder der entsprechenden Salzlösung. Diese Suspension wurde dann bei 4 °C und 6000 rpm 15 min in der Eppendorfsentrifuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für den nächsten Waschschrift erneut resuspendiert.

### 3.2.5 Verkapselung von ganzen Zellen

Die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen gentechnisch veränderten *E. coli*-Zellen JM109 wurden in zwei verschiedenen Materialien verkapselt.

#### 3.2.5.1 Verkapselung in Alginatkugeln

Die in Kapitel 3.3 hergestellten und toluolisierten Zellen wurden in einer 2 %igen Alginatlösung und einer 2 %igen Calciumchloridlösung verkapselt. Die Biofeuchtmasskonzentration betrug 15 %.

#### Herstellung der Alginatlösung:

Es wurde eine 2,5 %ige Alginatlösung hergestellt, indem 2,5 g Alginatpulver (Protanal LF20/60, Firma FMC Biopolymer AS, Haugesund (Norwegen)) langsam in 97,5 g deionisiertes H<sub>2</sub>O gegeben wurde und mehrere Stunden gerührt wurde, bis sich das Alginatpulver vollständig aufgelöst hat. Die Alginatlösung wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag vor der Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt.

#### Verkapselung der Biomasse:

Die in Kapitel 3.3 hergestellte Biofeuchtmasse wurde in einer Resuspendierungslösung (0,9 % NaCl, 100 mM MOPSO-Puffer, pH 7,0) im Verhältnis 3/4 Biofeuchtmasse und 1/4 Resuspendierungslösung in einem sterilen Becherglas mit Magnetrührer resuspendiert. Diese resuspendierte Biofeuchtmasse wurde wiederum im Verhältnis 1:5 zu der 2,5 %igen Alginatlösung dazugegeben und in einem sterilen Becherglas mit Magnetrührer so lange gerührt, bis sich die Lösungen vollständig durchmischt hatten. Diese Suspension, welche

nun 15 % BFM und 2% Alginat enthielt, wurde in die in Abbildung 3-4 dargestellte Verkapselungsapparatur gegeben und in eine 2 %ige Calciumchloridlösung getropft. Dort wurden die Kugeln 30 und 70 min gerührt und danach mit Hilfe eines Siebes von der Calciumchloridlösung abgetrennt und das Gewicht bestimmt. Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, konnte die Kugelgröße- und Form durch den oberen und seitlichen Abblasdruck variiert werden. Die genauen Eintropfbedingungen sind in Tabelle 3-3 angegeben. Die eingetropfte Menge an Alginat-Zell-Suspension wurde durch Wiegen des Abblaskopfes vor und nach dem Eintropfen ermittelt und mit dem Gewicht der hergestellten Kugeln ins Verhältnis gesetzt, um bei Aliquotierung der Kugeln eventuelle Quelleffekte auszuschließen und damit die genaue Menge an eingesetzter Biofeuchtmasse in den Versuchen bestimmen zu können. Es wurden allerdings kaum Quelleffekte beobachtet. Die Kugeln wurden portionsweise eingewogen und in einer Aufbewahrungslösung bei 4 °C bis zum Einsatz gelagert.

Tabelle 3-3: Verkapselungsbedingungen der in Kapitel 6 hergestellten Alginat/Carrageenankugeln

| Kapitel   | 5.2.3<br>5.2.4<br>5.2.5 | 5.3.2<br>kleine Kugeln | 5.3.2<br>große Kugeln | 5.3.3<br>5.3.4<br>5.4.1.2 |
|---|-------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------------|
| <b>Beladung der Alginat/Carrageenankugeln</b><br>[g <sub>BFM</sub> /g <sub>Immo</sub> ] | 0,15                    | 0,15                   | 0,15                  | 0,15                      |
| <b>h [cm]</b>   | 9,5                     | 10                     | 18                    | 9,5                       |
| <b>Rührgeschwindigkeit [rpm]</b>  | 200                     | 200                    | 200                   | 200                       |
| <b>c (Alginat/Carrageenan) [%]</b>  | 2                       | 2                      | 2                     | 3                         |
| <b>c (Calciumchlorid) [%]</b>   | 2                       | 2                      | 2                     | 2                         |
| <b>Eintropfzeit [min]</b>   | 10                      | 20                     | 20                    | 20                        |
| <b>Vernetzungsdauer [min]</b>   | 40                      | 60                     | 60                    | 70                        |
| <b>Oberer und seitlicher Abblasdruck [bar/bar]</b>                                      | 0,3/0,2                 | 0,2/0,15               | 0,2/0,1               | 0,35/0,15                 |
| <b>Durchmesser der Hohlkugeln [mm]</b>  | 0,6-0,7                 | 0,9                    | 1,4                   | 1,1                       |

### 3.2.5.2 Verkapselung in Carrageenankugeln

Die in Kapitel 3.3 hergestellten und toluolisierten Zellen wurden in einer 2 bzw. 3 %igen Carrageenanlösung und einer 2 %igen Calciumchloridlösung verkapselt. Die

Biofeuchtmasskonzentration betrug 15 %. Das hier verwendete Carrageenan war  $\kappa$ -Carrageenan (Gelcarin SA 911, Fa. FMC Biopolymer AS, Haugesund (Norwegen)).

#### Herstellung der Carrageenanlösung:

Es wurde eine 2,5 bzw. 3,75 %ige Carrageenanlösung hergestellt, indem 2,5 g bzw. 3,75 g Carrageenapulver langsam in 97,5 g bzw. 96,25 g heißes deionisiertes H<sub>2</sub>O gegeben und mehrmals in der Mikrowelle erhitzt wurde, bis sich das Carrageenapulver unter Rühren vollständig aufgelöst hatte. Da durch das Erhitzen Wasser verdunstet, wurde das Gewicht der fertigen Carrageenanlösung überprüft und auf 100 g mit deionisiertem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Carrageenanlösung wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag vor der Benutzung auf Raumtemperatur erwärmt.

#### Verkapselung der Biomasse:

Die in Kapitel 3.3 hergestellte Biofeuchtmasse wie auch in Kapitel wurde in einer Resuspendierungslösung (0,9 % NaCl, 100 mM MOPSO-Puffer, pH 7,0) im Verhältnis 3/4 Biofeuchtmasse und 1/4 Resuspendierungslösung in einem sterilen Becherglas mit Magnetrührer resuspendiert. Diese resuspendierte Biofeuchtmasse wurde im Verhältnis 1:5 zu der 2,5 bzw. 3,75 %igen Carrageenanlösung dazugegeben und in einem sterilen Becherglas mit Magnetrührer gerührt, bis sich die Lösungen vollständig durchmischt hatten. Die Suspension mit 15 % BFM und 2 bzw. 3 % Carrageenan wurde in die in Abbildung 3-4 dargestellte Verkapselungsapparatur gegeben und in die 2 %ige Calciumchloridlösung getropft. Dort wurden die Kugeln 30 und 70 min gerührt und danach 3fach in 2 %iger Kaliumchloridlösung gewaschen. Damit wurden die Calciumionen durch Kaliumionen ersetzt. Mit Hilfe eines Siebes wurden die Kugeln von der Kaliumchloridlösung abgetrennt und das Gewicht bestimmt. Die Kugelgröße- und Form konnte durch den oberen und seitlichen Abblasdruck variiert werden. Die genauen Eintropfbedingungen sind in Tabelle 3-3 angegeben. Die eingetropfte Menge wurde durch Wiegen der Abblasapparatur vor und nach Eintropfen der Carrageenan-Zell-Suspension ermittelt und mit dem Gewicht der hergestellten Kugeln ins Verhältnis gesetzt, um bei Aliquotierung der Kugeln eventuelle Quelleffekte auszuschließen und die genaue Menge an eingesetzter Biofeuchtmasse in den Versuchen bestimmen zu können. In Tabelle 3-3 sind die genauen Verkapselungsbedingungen der einzelnen Versuche aufgelistet. Die Kugeln wurden portionsweise eingewogen und in einer Aufbewahrungslösung (siehe Kapitel 3.3.2) bei 4 °C gelagert. Da während der Einsätze der Zellimmobilisate im Reaktionsmedium auch Ammoniumformiat als Substrat vorhanden war, wurden die Kaliumionen teilweise durch Ammoniumionen ersetzt, so dass diese Kugeln im Folgenden Carrageenankugeln genannt werden.

### 3.2.6 Einschluß von ganzen Zellen in PVAL-Linsen

Dieser Versuch wurde mit den Zellen *E.coli* BW3110 pAM92.1 durchgeführt, welche aus einer Hochzelllichtfermentation von Dr. Anne Menzel, Universität Stuttgart, stammten. Diese rekombinanten Zellen besitzen das Gen für die FDH und die LeuDH auf einem Plasmid, dem pAM92.1.

Zur Herstellung der PVAL-Linsen wurde die zur Verfügung gestellte Biomasse mit Wasser im Verhältnis 1:3 (Wasser:Biomasse) homogenisiert, so dass eine dicke Suspension entstand. Danach wurden 80 ml LentiKat®-Liquid in der Mikrowelle aufgeschmolzen und gerührt, bis keine sichtbaren Feststoffe mehr vorhanden waren. Nach dem Abkühlen auf ca. 30°C wurden 20 ml der zu immobilisierenden Suspension mit Hilfe eines Magnetrührers gut untergemischt, so dass die Biomassebeladung 15 % (15 g Biofeuchtmasse in 100 g Polymergemisch) betrug. Mit einem LentiKat®-Printer wurden von dieser Lösung pro Arbeitsschritt ca. 400 identische Tröpfchen auf mehrere große Petrischale übertragen und dort jeweils 50 min bzw. 70 min getrocknet. Anschließend wurde die Petrischale mit Stabilizerlösung überschichtet und die Hydrogele für 1 h hierin nachgehärtet. Die LentiKats® hatten eine einseitig abgeflachte Linsenform und waren bei einem Durchmesser von ungefähr 4 mm in der Mitte ca. 300 µm dick (s. Abbildung 3-5). Die in die Stabilizerlösung diffundierte Menge an Biomasse wurde mit Hilfe einer OD-Messung bestimmt und danach eine definierte Menge an biomassehaltigen PVAL-Linsen in einer bestimmten Menge an Reaktionslösung gerührt und nach einer Stunde die verlorene Biomasse in der Reaktionslösung ebenfalls mit Hilfe einer OD-Messung bestimmt. Damit wurde der Biomasseverlust aus den PVAL-Linsen in die umgebende Lösung im Vergleich zu der eingesetzten Biomasse in Prozent berechnet.

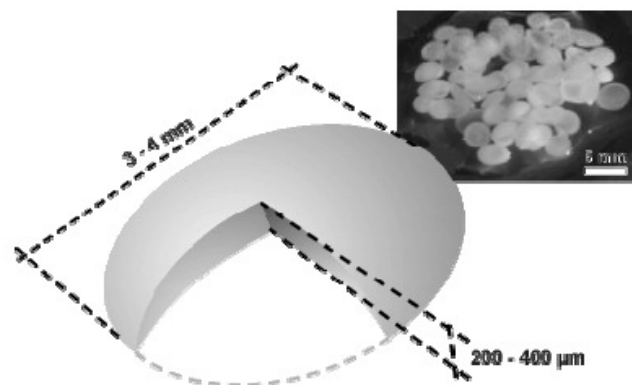


Abbildung 3-5: Foto und Skizze von LentiKats® [aus 178]

Da dieser Versuch an der Universität Stuttgart durchgeführt wurde und die Biofeuchtmasse von Frau Dr. Anne Menzel zur Verfügung gestellt wurde, wurde die BFM mittels eines Separators (CEPRA Z41G der Carl Padberg GmbH) bei 20.000 rpm abgetrennt und die OD-Messung inklusive Kalibrationskurve mit dem dortigen Photometer durchgeführt.

### 3.3 Ganzzellkatalysatoren

#### 3.3.1 Verwendete Zellen

Es wurden *E.coli* Zellen JM109 mit den Plasmiden pAM10.1 und pAM3.25 (siehe Abbildung 3-6) verwendet. Auf den Plasmiden waren die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (pAM3.25) und die Leucidehydrogenase (pAM10.1) aus *Bacillus cereus* codiert. Die Herstellung des Plasmids pAM3.25 erfolgte durch die Amplifikation des Gens der FDH aus *Candida boidinii* von dem Plasmid FDHC231SC262A und die Klonierung dieses Amplifikats in den Expressionsvektor pBW31, ein pBR322-Derivat. Zur Herstellung des Plasmids pAM10.1 wurde das Gen der LeuDH aus *Bacillus cereus* von dem Plasmid pLeu2 amplifiziert und in den Expressionsvektor pAW229, ein pACYC-Derivat, eingefügt. In beiden Plasmiden wurde die Genexpression durch den rhamnose-induzierbaren *E.coli* *rhaP<sub>BAD</sub>*-Promotor kontrolliert. pAM3.25 besaß eine Ampicillin-Resistenz und pAM10.1 besaß eine Chloramphenicol-Resistenz [103]. Die Plasmide wurden in die Wirtszellen JM109 und BW3113 transformiert. Die Zellen wurden von Frau Dr. Menzel, Universität Stuttgart, hergestellt. In dieser Arbeit wurden die Zellen JM109 verwendet, da diese Zellen im Schüttelkolben in den ersten 8 h der Genexpression bessere Ergebnisse bezüglich der Enzymaktivitäten erzielten, während *E. coli* BW3110 sein Expressionsoptimum erst zwischen 16 h und 20 h nach der Induktion zeigt. [102].

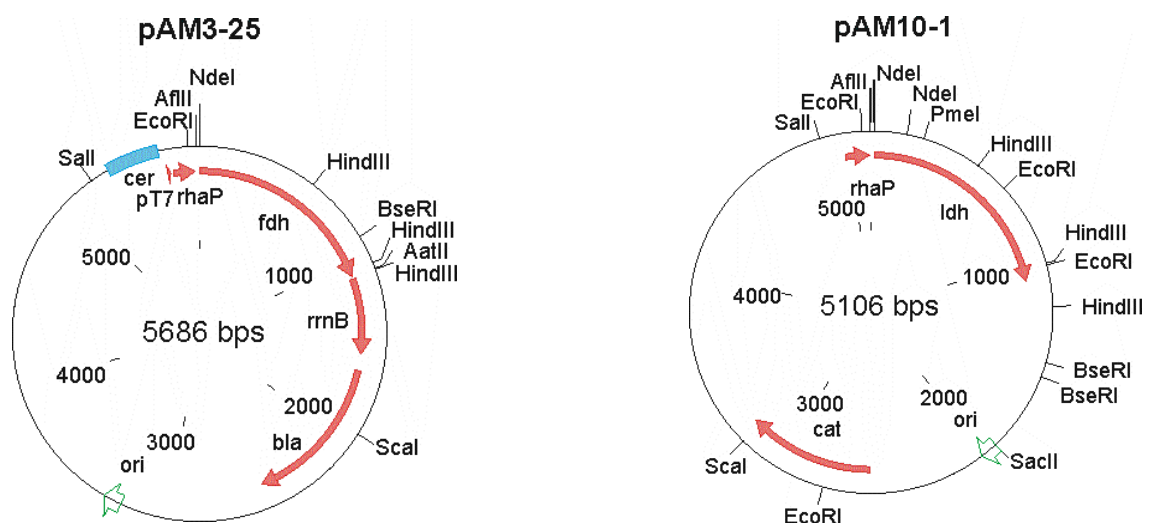


Abbildung 3-6: Plasmidkarten der Plasmide pAM10.1 und pAM3.25

Das Temperaturoptimum dieses Zweiplasmidsystems wurde von Frau Dr. Menzel zu 30 °C ermittelt, das pH-Optimum lag bei pH 7,0 [102]. Diese Bedingungen konnten in dieser Arbeit bestätigt werden und wurden in den weiteren Zellumsätzen mit diesen Zellen verwendet. Die Zellen wurden mir zur weiteren Verwendung als Einzelkolonien auf Agarplatten zur Verfügung gestellt. Entsprechend Kapitel 3.3.3 wurden Stammkulturen hergestellt, welche bei -20 °C gelagert und alle 4-6 Monate erneuert wurden.

### 3.3.2 Verwendete Medien zur Zellanzucht und Permeabilisierung

**LB-Medium:** 5g/l Hefeextrakt  
10 g/l Trypton  
5 g/l NaCl  
pH auf 7,2 mit NaOH

Das LB-Medium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

**Rhamnosestammlösung:** 100 g/l

Die Rhamnosestammlösung wurde mit Hilfe eines Celluloseacetatsterilfilter (Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert.

**Permeabilisierungslösung:** 0,9 % NaCl  
200 mM NH<sub>4</sub>For  
50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 7,0 mit NaOH

Die Permeabilisierungslösung wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

**Waschlösung:** 0,9 % NaCl  
20 mM MOPSO-Puffer  
pH 7,0 mit NaOH

Um eine sterile Waschlösung herzustellen, wurden 50 ml einer 1 M MOPSO-Puffer-Lösung (pH 7,0) mit Hilfe eines Celluloseacetatsterilfilter (Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert und 40 ml davon zu 2 l autoklavierter (121 °C, 20 min) 0,9 %iger NaCl-Lösung gegeben.

**Aufbewahrungspuffer:  
(Carrageenankugeln)** 0,9 % NaCl  
100 mM KPi (je 1:1 aus K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und )  
pH 7,0 mit NaOH

Der Aufbewahrungspuffer wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

**Aufbewahrungspuffer:  
(Alginatekugeln)** 0,9 % NaCl  
50 mM MOPSO-Puffer  
50 mM CaCl<sub>2</sub>  
pH 7,0 mit NaOH

Der Aufbewahrungspuffer wurde mit Hilfe eines Celluloseacetatsterilfilter (Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert.

**Chloramphenicolstammlösung:** 25 mg/ml, gelöst in EtOH, gelagert bei -20 °C

**Ampicillinstammlösung:** 100 mg/ml gelöst in H<sub>2</sub>O:EtOH, 1:1, gelagert bei -20 °C

**Glycerinkulturmedium:** Tryptonmedium: 10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
pH 7,2 mit NaOH

Das Tryptonmedium wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Das Glycerinkulturmedium wurde aus 50 % Glycerin (Glycerin, 98 %ig, autoklaviert bei 121 °C und 20 min) und 50 % Tryptonmedium hergestellt.

### 3.3.3 Stammhaltung

Von den gelieferten Agarplatten wurden jeweils Einzelkolonien in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin aus der Ampicillinstammlösung und 25 µg/ml Chloramphenicol aus der Chloramphenicolstammlösung resuspendiert und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Kulturen abzentrifugiert, in Glycerinkulturmedium resuspendiert und in sterilen Kryogefäßen bei -20 °C gelagert.

Um die gelagerten Kulturen nach 4-6 Monaten zu erneuern, wurden die Kulturen auf Agarplatten ausgestrichen, 24-48 h bei 30 °C inkubiert, aus Einzelkolonien erneut, wie oben beschrieben, Glycerinkulturen hergestellt und bei -20 °C gelagert.

### 3.3.4 Anzucht der Vorkultur

Für die Vorkultur wurden am Vortag der Hauptkultivierung zu einer adäquaten Menge an LB-Medium (ungefähr 1/5 der gewünschten Hauptkulturmenge) 100 µg/ml Ampicillin aus der Ampicillinstammlösung, 25 µg/ml Chloramphenicol aus der Chloramphenicolstammlösung und die Stammkultur im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben. Die Vorkultur wurde dann mit je 200 ml in 500 ml Schüttelkolben mit Schikanen aufgeteilt und bei 30 °C und 110 rpm für ungefähr 19,5 Stunden inkubiert.

### 3.3.5 Anzucht der Hauptkultur

Nach 19,5 Stunden wurde von der Vorkultur die OD bei 605 nm gemessen und berechnet, wie viel davon für die gewünschte Menge an Hauptkultur notwendig ist (Formel 3-5).

$$V_{\text{animpf}} = \frac{V_{\text{gesamt}} * 0,4}{OD_{605}}$$

$V_{\text{animpf}}$ : Animpfvolumen  
 $V_{\text{gesamt}}$ : Gesamtvolumen  
 $OD_{605}$ : OD bei 605 nm

---

Formel 3-5: Berechnung des Animpfvolumens

Die Anfangs-OD<sub>605</sub> der Hauptkultur sollte 0,4 betragen. Das Volumen des notwendigen LB-Mediums für die Hauptkultur ergab sich dann aus dem Volumen der Vorkultur und aus dem Gesamtvolumen der Hauptkultur.

Zu dem Gesamtvolumen der Hauptkultur wurden wieder jeweils 25 µ/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Ampicillin aus den Stammlösungen der Antibiotika hinzugegeben. Für die Induktion der Genexpression der beiden Enzyme Formiatdehydrogenase und Leucindehydrogenase wurde 0,2 % Rhamnose aus der Rhamnosestammlösung hinzugefügt. Die Hauptkultur wurde 9 Stunden bei 30 °C und 110 rpm mit je 400 ml in 1000 ml Schüttelkolben inkubiert. Nach 9 Stunden wurden die Zellen in der Becherzentrifuge bei 4600 rpm und 4 °C 20 min abzentrifugiert, der Überstand bis auf ~ 40 ml verworfen, die Zellen in dem Rest des Überstandes resuspendiert und in einem sterilen, abgewogenen Falconröhrchen über Nacht bei 4°C gelagert.

### **3.3.6 Permeabilisierung der Zellwand**

Die über Nacht gelagerten Zellen wurden in der Falconröhrchenzentrifuge bei 8500 rpm und 4°C für 20 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Gewicht der entstandenen Biofeuchtmasse (BFM) bestimmt, um ein Maß für die Güte der Zellanzucht zu bekommen.

Für die Permeabilisierung wurden ungefähr 5 g BFM mit 35 ml Permeabilisierungslösung (siehe Kapitel 3.3.2) und 525 µl Toluol als Permeabilisierungsreagenz (15 µl/ml) versetzt und auf einem Magnetrührer für 15 min bei 30 °C stark gerührt. Nach 15 min wurde die entstandene Zellsuspension bei 8500 rpm und 4°C für 20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Zellumgebung von Toluol zu befreien, wurde die Biofeuchtmasse in ~800 ml Waschlösung (siehe Kapitel 3.3.2) resuspendiert, gewaschen und in der Becherzentrifuge bei 4600 rpm und 4°C 20 min abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, danach wurden die Zellen in ~ 40 ml Waschlösung resuspendiert, in ein steriles Falconröhrchen überführt und wiederum in der Falconröhrchenzentrifuge bei 8500 rpm und 4°C für 20 min abzentrifugiert. Die resultierende, toluolisierte Biofeuchtmasse wurde in ein Becherglas überführt, abgewogen und mit einer definierten Menge (~ ¼ des Gesamtgewichtes der Biofeuchtmasse) an Milliporewasser versetzt, um eine dickflüssige Suspension zu bekommen. Diese Suspension wurde entweder in sterile Eppendorfgefäße aliquotiert, wobei das jeweilige Gewicht des Biofeuchtmassealiquots auf einer Analysenwaage gemessen wurde, und bis zum Einsatz bei 4 °C aufbewahrt oder zur Immobilisierung verwendet (siehe Kapitel 3.2.5 und 3.2.6).





erwarteten Konzentration für die HPLC-Messung mit millipore Wasser verdünnt. Die TMP-Konzentration der verdünnten Proben wurde entsprechend Kapitel 3.1.2 mittels HPLC gemessen. Die Zellaktivität wurde entsprechend Formel 3-7 berechnet. In Abbildung 3-7 sind als Beispiel einige typische Umsatzkurven zu sehen.

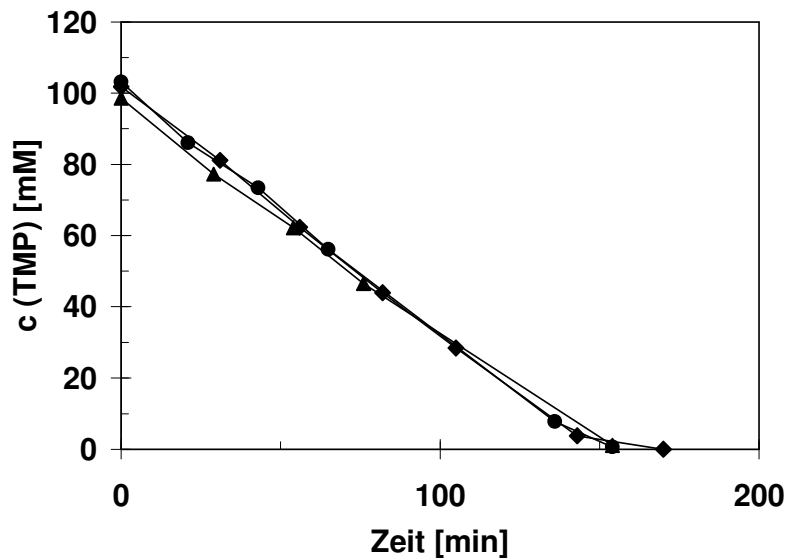


Abbildung 3-7: Typische Umsatzkurven zur Bestimmung der Zellaktivität

Tabelle 3-5: Standardbedingungen der Aktivitätsmessung von Alginat- und Carrageenankugeln

|                             | Freie Zellen                            | Alginatkugeln  | Carrageenankugeln  |
|-----------------------------|---|--|--|
| $V_{\text{gesamt}}$         | 10-15 ml                                | 10-15 ml   | 10-50 ml   |
| pH-Wert                     | 7,0 $\pm$ 0,2                           | 7,0 $\pm$ 0,2  | 7,0 $\pm$ 0,2  |
| TMP                         | 100 mM                                  | 100 mM   | 100 mM   |
| $\text{NH}_4\text{Formiat}$ | 300 mM                                  | 300 mM   | 300 mM   |
| NAD                         | 4 mM                                    | 4 mM   | 4 mM   |
| $\text{MgCl}_2$             | 1 mM                                    | 1 mM   | 1 mM   |
| MOPSO-Puffer                | 100 mM                                  | 100 mM   | 100 mM   |
| Biofeuchtmasse              | 0,03 – 0,2 g/ml (je nach Zellaktivität) | $\sim 0,03 \text{ g/ml} = 0,2 \text{ g}_{\text{Kugeln}}/\text{ml}_{\text{Medium}}$ | $\sim 0,03 \text{ g/ml} = 0,2 \text{ g}_{\text{Kugeln}}/\text{ml}_{\text{Medium}}$ |
| Calciumchlorid              | 50-100 mM (Alginat)                     | 50-100 mM  | /  |
| Kaliumchlorid               | 100-200 mM (Carrageenan)                | /  | 100-200 mM   |

$$\text{Aktivität} \left[ \frac{\mu\text{mol}_{\text{TMP}}}{\text{g}_{\text{BFM}} * \text{min}} \right] = \frac{c(\text{TMP}) [\mu\text{mol} / \text{ml}] * V_{\text{gesamt}} [\text{ml}]}{m_{\text{BFM}} [\text{g}] * t [\text{min}]}$$

---

Formel 3-7: Berechnung der Zellaktivität (freie Zellen und Immobilisate)

### 3.3.7.1 Messung der Zellaktivität bei freien Zellen

Die Messung der Zellaktivität erfolgte in einem mit Wasser temperierbarem Glasgefäß mit einem Magnetrührer. Die Standardbedingungen der Reaktion sind in Tabelle 3-5 im Einzelnen beschrieben.

Bei Untersuchungen der Wirkung verschiedener Substratkonzentrationen auf die Zellaktivität wurden die Konzentrationen von TMP,  $\text{NH}_4$ -Formiat und NAD variiert. Je nachdem, ob die Aktivität mit den in Alginate oder in Carrageenan verkapselten Zellen verglichen werden sollte, wurde noch entsprechend Kalium- oder Calciumchlorid hinzugefügt.

Für die Messung wurde zunächst die Biofeuchtmasse in der Reaktionslösung ohne NAD sorgfältig resuspendiert. Die Messung wurde dann durch die Zugabe von NAD gestartet und wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben durchgeführt.

### 3.3.7.2 Messung der Zellaktivität bei immobilisierten Zellen

Die Messung der Zellaktivität der immobilisierten Zellen erfolgte ebenfalls in einem mit Wasser temperierten Glasgefäß, allerdings konnte nur für die in Alginate verkapselten Zellen ein Magnetrührer benutzt werden, da die Carrageenankugeln von dem Rührfisch des Magnetrührers zerschert wurden (siehe Kapitel 5.3.1). Daher wurde für diese Kugeln ein Scheibenrührer genutzt, wie er in Kapitel 3.1.1.5 zur Messung der Polyelektrolytkugeln verwendet wurde.

In Tabelle 3-5 sind die Standardbedingungen für die Alginate- und Carrageenankugeln im Einzelnen beschrieben.

Zu den Alginatkugeln wurde Calciumchlorid hinzugefügt, um diese zu stabilisieren. Bei hohen Konzentrationen von Salzen wie Natrium oder Ammonium quellen die Alginatkugeln sehr stark, so dass das Verhältnis von Calcium zu der molaren Summe an anderen Elektrolyten nicht größer als 1:20 sein sollte (siehe Kapitel 2.6.1.4).

Da Carrageenanimmobilisate nicht empfindlich auf Phosphat und hohe Konzentrationen an Salzen reagieren, konnte anstelle von MOPSO-Puffer auch der kostengünstigere

Kaliumphosphatpuffer benutzt werden. Auch die Zugabe von Calciumchlorid ist nicht notwendig, da die Carrageenankugeln durch Kalium hinreichend stabilisiert werden. Bei Untersuchungen der Wirkung verschiedener Substratkonzentrationen auf die Zellaktivität wurden die Konzentrationen von TMP,  $\text{NH}_4\text{Formiat}$  und NAD entsprechend variiert.

Die Messung wurde jeweils durch die Zugabe von NAD gestartet. Die Messung erfolgte wie oben in Kapitel 3.3.7 beschrieben.

### **3.3.8 Mehrfacheinsatz von Immobilisaten**

Der Mehrfacheinsatz der Immobilisate erfolgte durch das Abnehmen des Umsatzmediums mit Hilfe einer sterilen Einmalpipette (25 ml oder 50 ml). Die sterile Einmalpipette war an ihrer Spitze mit einem Stück Perlonstrumpf einer normalen Perlonstrumpfhose überzogen, so dass beim Abtrennen des Umsatzmediums von den Immobilisaten keine Kugeln in die Pipette gelangen konnten. Dies minimierte den Verlust an Immobilisatkugeln zwischen den Einsätzen und schonte die Gelkugeln. Bevor frisches Medium für den nächsten Einsatz zu den Immobilisaten gegeben wurde, erfolgte ein mehrmaliges Waschen der Kugeln mit der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Aufbewahrungslösung, um Produkte und Edukte des vorhergehenden Umsatzes zu entfernen.

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION:

### IMMOBILISIERUNG DER FDH UND DER LEUDH ALS ISOLIERTE ENZYME

Um die Enzyme FDH und LeuDh innerhalb eines cofaktorregenerierenden Systems mehrfach einsetzen zu können und damit Kosten zu sparen, sollten diese Enzyme immobilisiert werden. Die folgenden Gütekriterien sind für die Beurteilung der hier untersuchten Immobilisierungsmethoden zu Grunde gelegt worden:

- **Einfache und kostengünstige Immobilisierungsmethode:** dieses Kriterium wurde bei der theoretischen Auswahl der zu untersuchten Immobilisierungsmethoden angewendet.
- **Geringe Inaktivierung der Enzyme durch die Immobilisierung:** hierzu wurde die Restaktivität des Immobilisates im Vergleich zur eingesetzten Enzymmenge gemessen. Eine hohe Restaktivität ist wichtig, um die Menge des im Prozess einzusetzenden Immobilisates und damit die Kosten dafür zu minimieren.
- **Gute Prozess-Stabilität, hohe Langzeitaktivität und mechanische Stabilität der Immobilisate:** hierzu wurden die Immobilisate mehrfach eingesetzt und die Enzymaktivität in jedem Einsatz gemessen. Eine gute Langzeitaktivität ist bei einem geringen Verlust der Enzymaktivität nach einem Mehrfacheinsatz erreicht. Die mechanische Stabilität der Immobilisate wurde durch die Beobachtung der Immobilisate im Stereomikroskop vor und nach den Einsätzen überprüft.

#### 4.1 Vorversuche zur FDH und zur LeuDh

Als Vorversuche wurden die Stabilität der LeuDh und die Stabilität der FDH getestet, um auszuschließen, dass eines der Enzyme oder beide allein durch Lagerung oder die verwendeten pH-Werte an Aktivität verliert.

##### 4.1.1 FDH

###### 4.1.1.1 PH-Wert Stabilität

Um für weitere Immobilisierungsexperimente zu ermitteln, inwieweit die FDH während der Lagerung bei verschiedenen pH-Werten stabil bleibt oder an Aktivität verliert, wurde die FDH in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten, welche mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer gepuffert wurden, bei 25 °C inkubiert. Nach bestimmten Zeitintervallen erfolgt die Bestimmung der verbliebenen Enzymaktivität. Die überprüften pH-Werte waren 5,6; 6,6; 7,1; 7,6; 8,1 und 8,5, da der Arbeitsbereich der Immobilisierung und der Lagerung innerhalb dieses pH-Bereiches lag. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte gemäß Kapitel 3.1.1.1. und 3.1.1.3 bei einem pH-Wert von 8,2. Die maximale Inkubationszeit lag bei 1400 min. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-1 gezeigt.

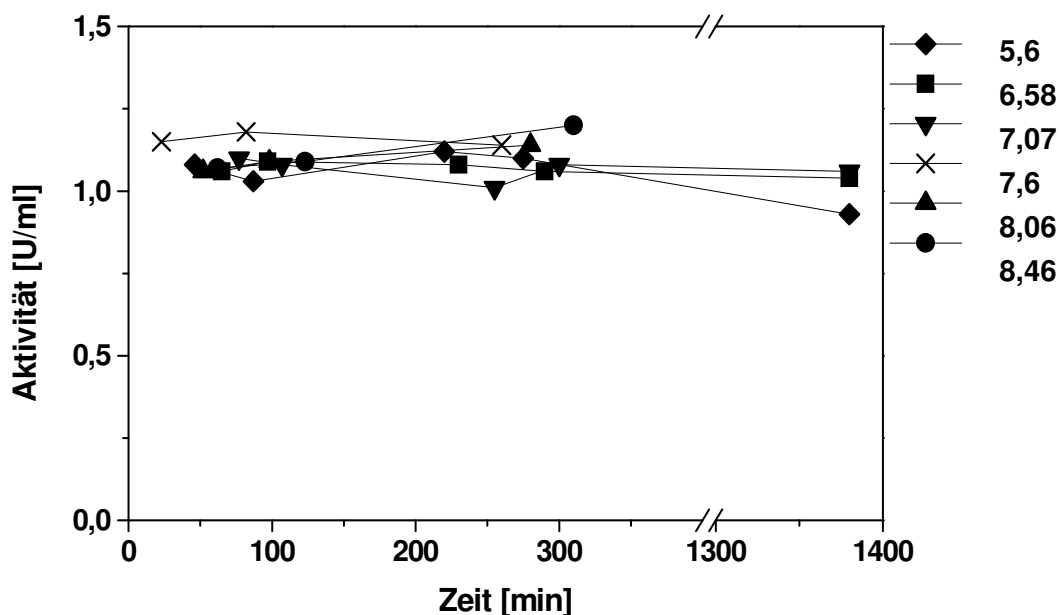


Abbildung 4-1: Stabilität der FDH bei unterschiedlichen pH-Werten

Wie in Abbildung 4-1 deutlich wird, bleibt die FDH bis zu einer Zeit von ~300 min bei allen der überprüften pH-Werte stabil. Erst nach 1400 min (~23 h) bei pH 5,6 ist ein Aktivitätsverlust von 14 % zu beobachten. Dies bedeutet, dass der Einfluß des pH-Wertes eine geringe Rolle bei der Inaktivierung der FDH spielt.

#### 4.1.1.2 Stabilität der FDH in der Reaktionslösung bei 30 °C

Um zu wissen, ob die FDH während der Herstellung der Immobilisate an Aktivität verliert, wurde die Lagerstabilität bei 30 °C überprüft. Dazu wurde 1 U/ml FDH in 0,4 M Natriumformiat und 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 8,2 und 30 °C unter Rühren inkubiert und die verbliebene Enzymaktivität gemäß Kapitel 3.1.1.1. und 3.1.1.3 nach bestimmten Zeitintervallen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-2 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass auch nach 14 Stunden bei 30 °C kein Enzymverlust festzustellen ist. Der Immobilisierungsprozeß, welcher bei Raumtemperatur stattfindet, liegt unter der Zeit von 14 Stunden.

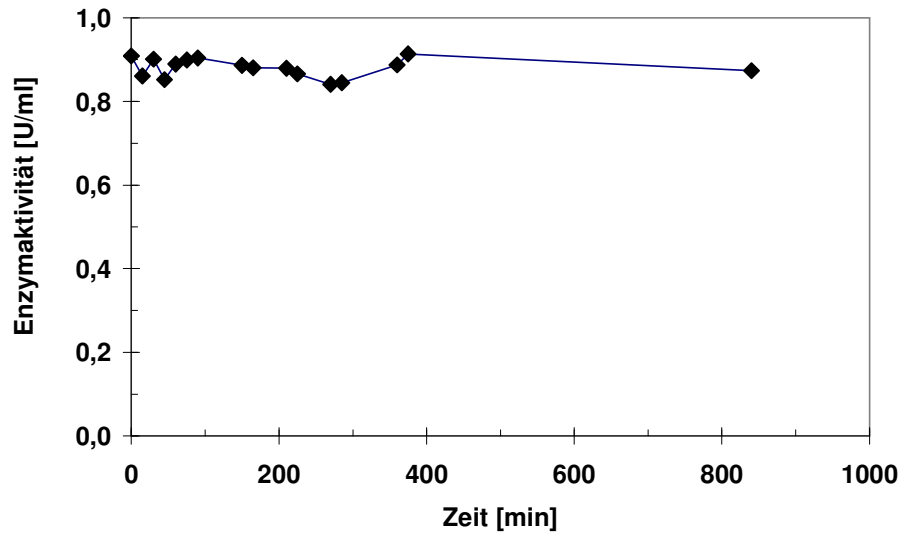


Abbildung 4-2: Stabilität der FDH bei 30 °C

#### 4.1.2 LeuDh

Um die pH-Wert Stabilität der LeuDh zu überprüfen, wurde die LeuDh in 50 mM Kaliumphosphatpuffer der pH-Werte 5,9, 6,5, 7,0, 7,5 und 8,2 bei Raumtemperatur inkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurden Proben genommen und die verbleibende Enzymaktivität der LeuDh gemäß Kapitel 3.1.1.2 und 3.1.1.3. bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-3 zu sehen.

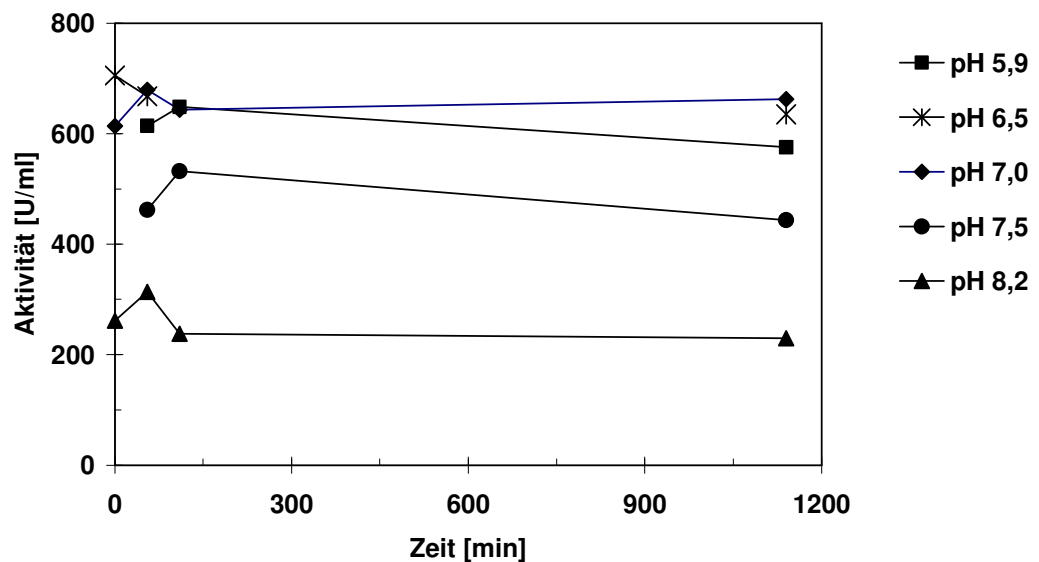


Abbildung 4-3: Stabilität der LeuDh bei unterschiedlichen pH-Werten

Wie in Abbildung 4-3 zu erkennen ist, hat der pH-Wert keinen signifikanten Einfluß auf die Stabilität der LeuDh. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Schütte et al. [146] überein. Die

Schwankungen der Enzymaktivitäten und die unterschiedlichen Anfangaktivitäten sind auf Messungenauigkeiten und Pipettierungenauigkeiten zurückzuführen.

## **4.2 Immobilisierung der FDH**

Da die FDH das empfindlichere der beiden Enzyme ist, wurde zunächst versucht, die FDH zu immobilisieren. Dazu wurden verschiedene Methoden verwendet. Erst nachdem für die FDH eine geeignete Immobilisierungsmethode gefunden wurde, erfolgte das gemeinsame Immobilisieren der FDH und der LeuDH.

### **4.2.1 Coquervernetzung der FDH mit Glutardialdehyd und Chitosan**

#### **4.2.1.1 Direkte Coquervernetzung der FDH mit Glutardialdehyd und Chitosan**

Diese Immobilisierungsmethode basiert wie in Kapitel 2.5.1. beschrieben auf der kovalenten Vernetzung der  $\text{NH}_2$ -Gruppen des Enzyms mit den Aldehydgruppen des Glutardialdehyds. Als Co-Crosslinkingreagenz wurde Chitosan dazugegeben. Dies kann eventuell die schädigende Wirkung des reaktiven Glutardialdehyd auf die Aktivität der FDH etwas herabsetzen. Die Reaktion dieser Methode ist schematisch in Abbildung 4-4 dargestellt. Es entstehen dabei makroskopisch sichtbare Enzymflocken, die sich gegebenenfalls in Hydrogele wie zum Beispiel Lentikats® einschließen lassen. Dies wurde schon erfolgreich von Capan 2004 [18] und Jahns 2001 [59] praktiziert, wo jeweils die (R)-Oxynitrilase und die Inulase II immobilisiert wurden.

Vorteile dieser Methode sind:

- **Einfache Immobilisierungsmethode in nur zwei Schritten:** dies ist für eine erfolgreiche Umsetzung in den industriellen Maßstab wichtig.
- **Kostengünstige Immobilisierungsreagenzien:** Beide Reagenzien, Glutardialdehyd und Chitosan, sind kostengünstig. Dies ist für die Reduzierung der Immobilisierungskosten und damit für einen ökonomischen Immobilisierungsprozeß wichtig. Chitosan ist ein Polyglucosamin, welches durch Deacetylierung der acetylierten Aminogruppe aus Chitin hergestellt wird. Chitin ist eine weit verbreitete Stützsubstanz, ist ein Bestandteil des Exoskeletts vieler wirbelloser Tiere und kommt in den Zellwänden vieler Pilze vor. Da Chitin ein Abfallprodukt der muschel- und krebsverarbeitenden Industrie ist, stellt es ein preiswertes Ausgangsmaterial für die Herstellung von Chitosan dar. Industriell wird Chitosan als Flockungsmittel, Bindemittel für Textilien und Fasern und als Klebstoff in der Lederindustrie angewendet. Die Herstellung von Lentikats® ist ebenfalls kostengünstig.



- **Stabile Immobilisate:** durch die kovalente Bindung des Enzyms mit Glutardialdehyd können häufig sehr langzeitstabile Immobilisate erreicht werden. Der Einschluß in Lentikats® ergibt zusätzlich mechanisch stabile, einfach zu handhabende Immobilisate.

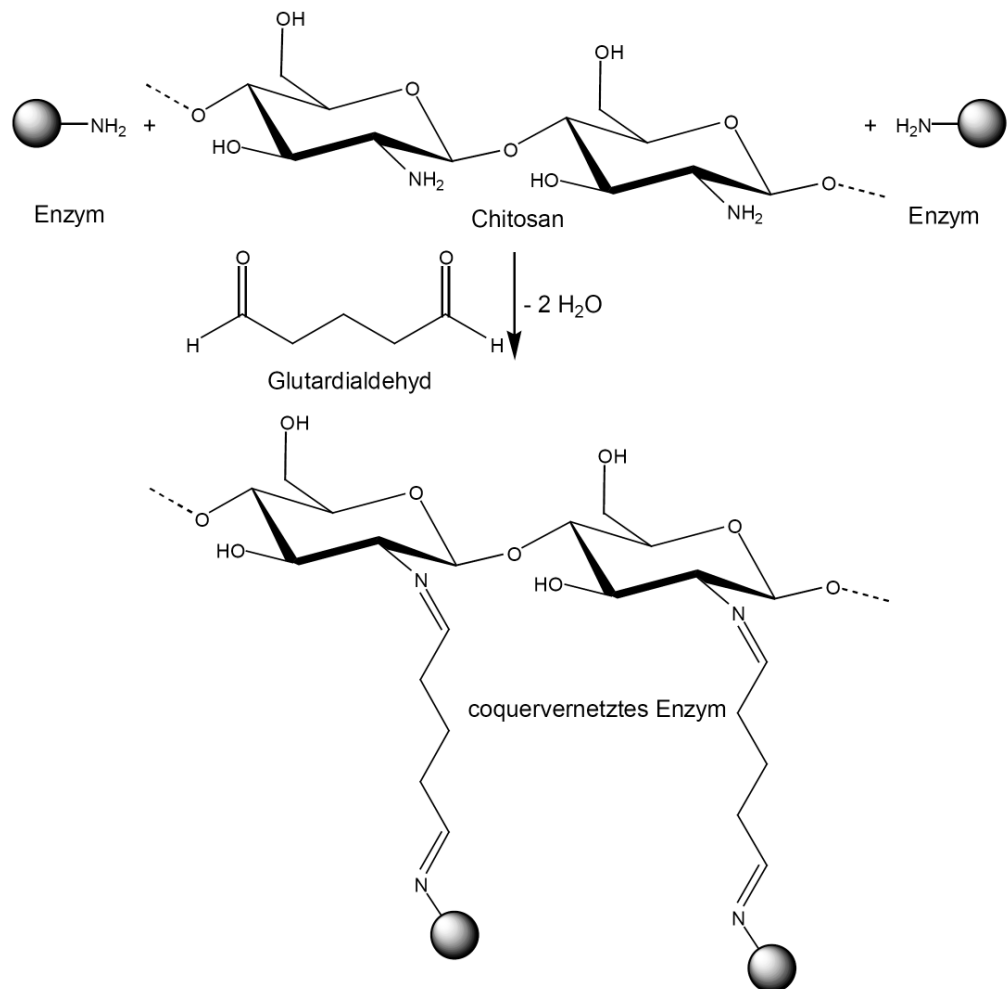


Abbildung 4-4: direkte Coquervernetzung des Enzyms mit Chitosan und Glutardialdehyd (vereinfacht dargestellt) (aus [19])

Nachteilig (wie in Kapitel 2.5.1 erwähnt) kann jedoch ein Aktivitätsverlust des zu immobilisierenden Enzyms sein.

In diesem Kapitel wird untersucht, ob diese Immobilisierungsmethode für die FDH anwendbar ist. Dabei muss zunächst überprüft werden, ob die FDH durch den chemischen Eingriff der kovalenten Bindung an Aktivität verliert. Die FDH wurde gemäß Kapitel 3.2.2 immobilisiert, wobei die eingesetzte Chitosanmenge 13,5 mg und die Enzymmenge 4 mg betrug. Die zugegebene Glutardialdehydmenge betrug 0; 1,4; 2,8; 4,48; 11,2 und 28 mg. Nach der Immobilisierung wurde die verbliebene Enzymaktivität der FDH der entstandenen

Suspension entsprechend Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.4 gemessen und die Restaktivität entsprechend der Formel 3-2 (3) berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-5 dargestellt.

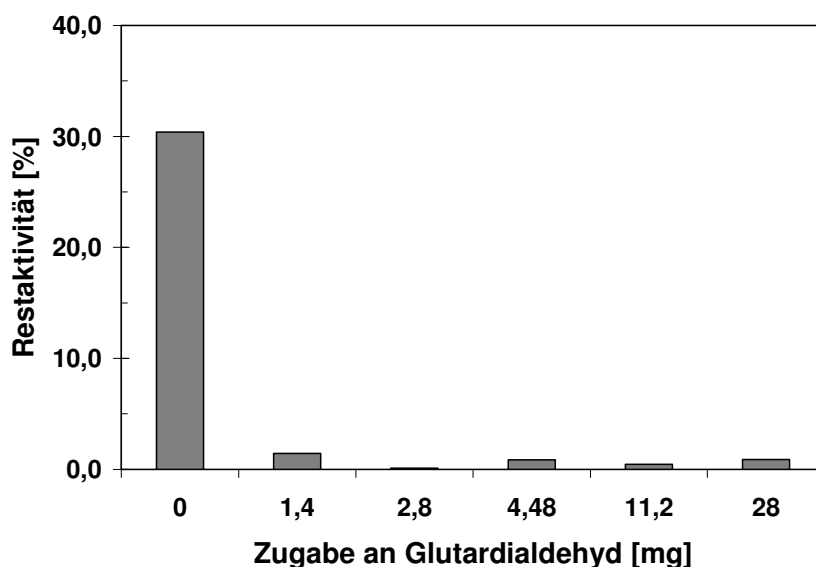


Abbildung 4-5: Restaktivität der FDH in Abhängigkeit der zugegebenen Menge an Glutardialdehyd

Wie in Abbildung 4-5 zu sehen ist, wurde die FDH während des Immobilisierungsprozesses vollständig inaktiviert. Daher wurde auf weitere Berechnungen wie in Kapitel Formel 4-1 verzichtet. Einer der Gründe für die Inaktivierung kann sein, dass die aktiven Gruppen des Glutardialdehyd Aminogruppen im aktiven Zentrum der FDH, welche in Abbildung 4-6 beispielhaft von der *Pseudomonas sp.* 101-FDH zu sehen sind, angegriffen haben und die FDH damit inaktiviert wurde. Dies könnten z.B., wie in Abbildung 4-6 ersichtlich, die freien Aminogruppen des Arginins oder der Asparaginsäure sein. Weiterhin ist auch eine Konformationsänderung des Proteins durch die kovalente Bindung möglich, was ebenfalls eine Inaktivierung der Enzymaktivität zur Folge haben kann. Die Möglichkeit der Inaktivierung des NAD's während der Enzymaktivitätsmessung durch Glutardialdehyd, was nicht während der Immobilisierung reagiert hat, wurde in einem entsprechenden Vorexperiment (hier nicht beschrieben) ausgeschlossen.

Auffällig ist, dass selbst in dem Versuch, indem die FDH ohne Glutardialdehyd nur mit Chitosan bei pH 5,5 inkubiert wurde, eine Inaktivierung von 70 % im Vergleich zum unbehandelten Enzym erfolgt.

Auf weitere Berechnungen wurde aufgrund der geringen Restaktivität verzichtet. Im Folgenden wurde versucht, die FDH inaktivierenden Einflußfaktoren zu vermeiden.

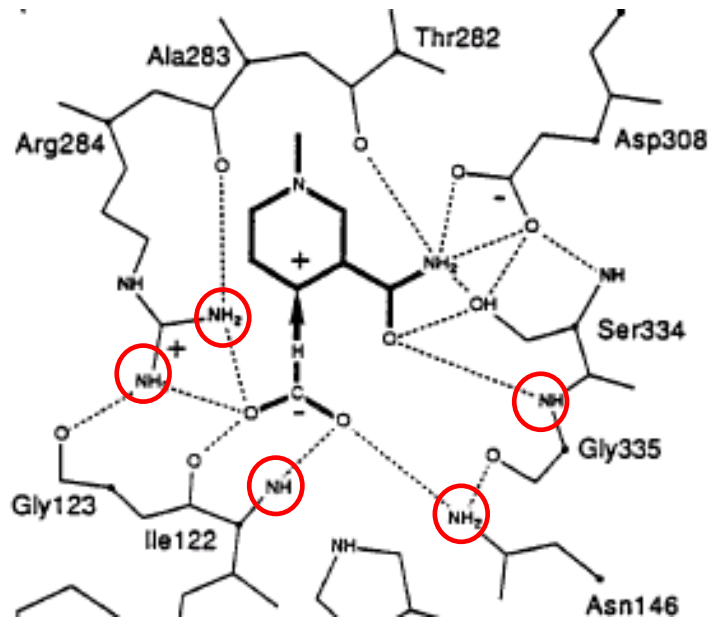


Abbildung 4-6: Räumliche Darstellung des aktiven Zentrums der *Pseudomonas sp.* 101-FDH. Gezeigt sind die Lage des NADs und Formiats im aktiven Zentrum und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Die Wasserstoffbrücken-Bindungen sind mit gestrichelten Linien dargestellt, die Aminoreste sind rot umkreist. [86]

#### 4.2.1.2 Bindung der FDH an mit Glutardialdehyd aktivierte Chitosanflocken

Diese Immobilisierungsmethode hat den Vorteil, dass der pH-Wert in einem für die FDH günstigen Bereich liegen kann.

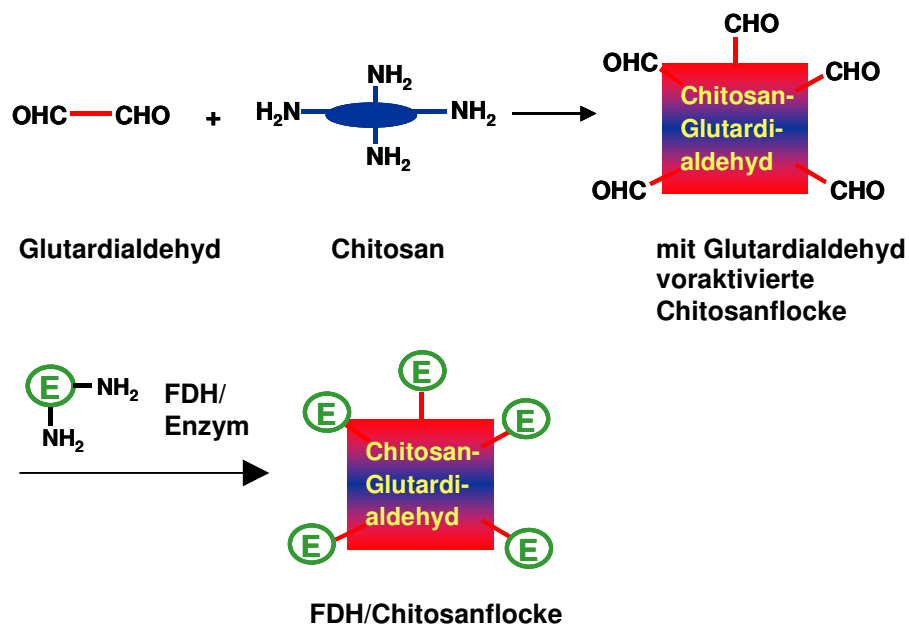


Abbildung 4-7: Coquervernetzung der FDH an mit Glutardialdehyd aktivierte Chitosanflocken

Außerdem ist es möglich, dass vor allem freies Glutardialdehyd die FDH schädigt, indem es in das aktive Zentrum eindringen kann. Dieses freie Glutardialdehyd liegt im folgenden Versuch nicht vor. Das Prinzip dieser Immobilisierungsmethode ist in Abbildung 4-7

verdeutlicht. Es basiert darauf, dass gering konzentriertes Chitosan mit Glutardialdehyd in mindestens 10fachem Überschuss zu makroskopisch sichtbaren Flocken reagieren kann. Die entstandenen Flocken besitzen an ihrer Oberfläche viele reaktive Aldehydgruppen des Glutardialdehyds, welche mit den Aminogruppen der FDH reagieren können.

Die genaue Vorgehensweise zur Herstellung dieser Immobilisate ist in Kapitel 3.2.3 erläutert. Um optimale Immobilisierungsergebnisse zu erzielen, wurde die Menge an eingesetzter FDH pro Menge Immobilisat variiert. Dadurch wurde versucht, die Beladung des Immobilisates, also die Menge an aktivem, gebundenem Enzym pro Gramm Immobilisat, zu erhöhen. Die Beladung ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Immobilisates, da eine höhere Beladung des Immobilisates mit aktiver FDH zu einer höheren Produktivität des Prozesses führt. Es wurden jeweils 405, 1260, 1421 und 2576 mg Protein pro g Immobilisat (Trockenmasse) eingesetzt. Die jeweils verbliebene Menge an aktiver FDH im Überstand, die Enzymaktivität im Immobilisat und die Enzymaktivität der gesamten Suspension wurde gemäß Kapitel 3.1.1.1, 3.1.1.3 und 3.1.1.4 gemessen.

1

$$RestEA_{\text{über}} [\%] = \frac{EA_{\text{über}} \left[ \frac{U}{ml} \right] * V_{\text{Ansatz}} [ml]}{EA_{\text{eingesetzt}} [U]} * 100$$

2

$$RestEA_{\text{immo}} [\%] = \frac{EA_{\text{immo}} [U]}{EA_{\text{eingesetzt}} [U]} * 100$$

3

$$Beladung \left[ \frac{U}{g_{\text{immo}}} \right] = \frac{EA_{\text{immo}} [U]}{m_{TSimmo} [g_{\text{immo}}]}$$

4

$$EA_{\text{desakt}} [\%] = 100 [\%] - \frac{EA_{\text{sus}} \left[ \frac{U}{ml} \right] * V_{\text{ansatz}} [ml]}{EA_{\text{eingesetzt}} [U]} * 100$$

|                 |                    |                                    |                            |                                    |
|-----------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| <i>Indices:</i> | <i>immo:</i>       | <i>immobilisiert</i>               | <i>RestEA:</i>             | <i>Restenzymaktivität</i>          |
|                 | <i>über:</i>       | <i>Überstand</i>                   | <i>m<sub>TSimmo</sub>:</i> | <i>Masse des Immobilisates als</i> |
|                 | <i>desakt:</i>     | <i>desaktiviert</i>                |                            | <i>Trockensubstanz</i>             |
|                 | <i>sus:</i>        | <i>Suspension</i>                  | <i>EA:</i>                 | <i>Enzymaktivität</i>              |
|                 | <i>eingesetzt:</i> | <i>eingesetzt (Enzymaktivität)</i> |                            |                                    |

Formel 4-1:

Berechnungen der

- (1) Restaktivität im Überstand [%]
- (2) Restaktivität im Immobilisat [%]
- (3) Enzymbeladung des Immobilisates [U/g<sub>immo</sub>]
- (4) Desaktivierte Enzymmenge [%]

Durch die Messung der Enzymaktivität der Suspension konnte die Menge an inaktiviertem Enzym gemäß Formel 4-1 (4) bestimmt werden. Die Restaktivitäten des Überstandes und des Immobilisates in [%] wurden mit Hilfe der eingesetzten Enzymaktivität gemäß Formel 4-1 (1) und (2) berechnet. Weiterhin wurde die Beladung des Immobilisates mit aktivem Enzym in [U/g<sub>immo</sub>] gemäß Formel 4-1 (3) berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-8

dargestellt. Wie dort zu sehen ist, konnte die Restaktivität bei kleinen Mengen an eingesetztem Enzym auf 9 % (s. Abbildung 4-8 A) und die Beladung des Immobilisates bei 1421  $\text{mg}_{\text{protein}}/\text{g}_{\text{immo}}$  eingesetztem Enzym auf 391  $\text{U}/\text{g}_{\text{immo}}$  (s. Abbildung 4-8 B) gesteigert werden. Allerdings wird das verbliebene Enzym im Überstand bei geringen Mengen an eingesetztem Enzym sehr stark inaktiviert (s. Abbildung 4-8 A).

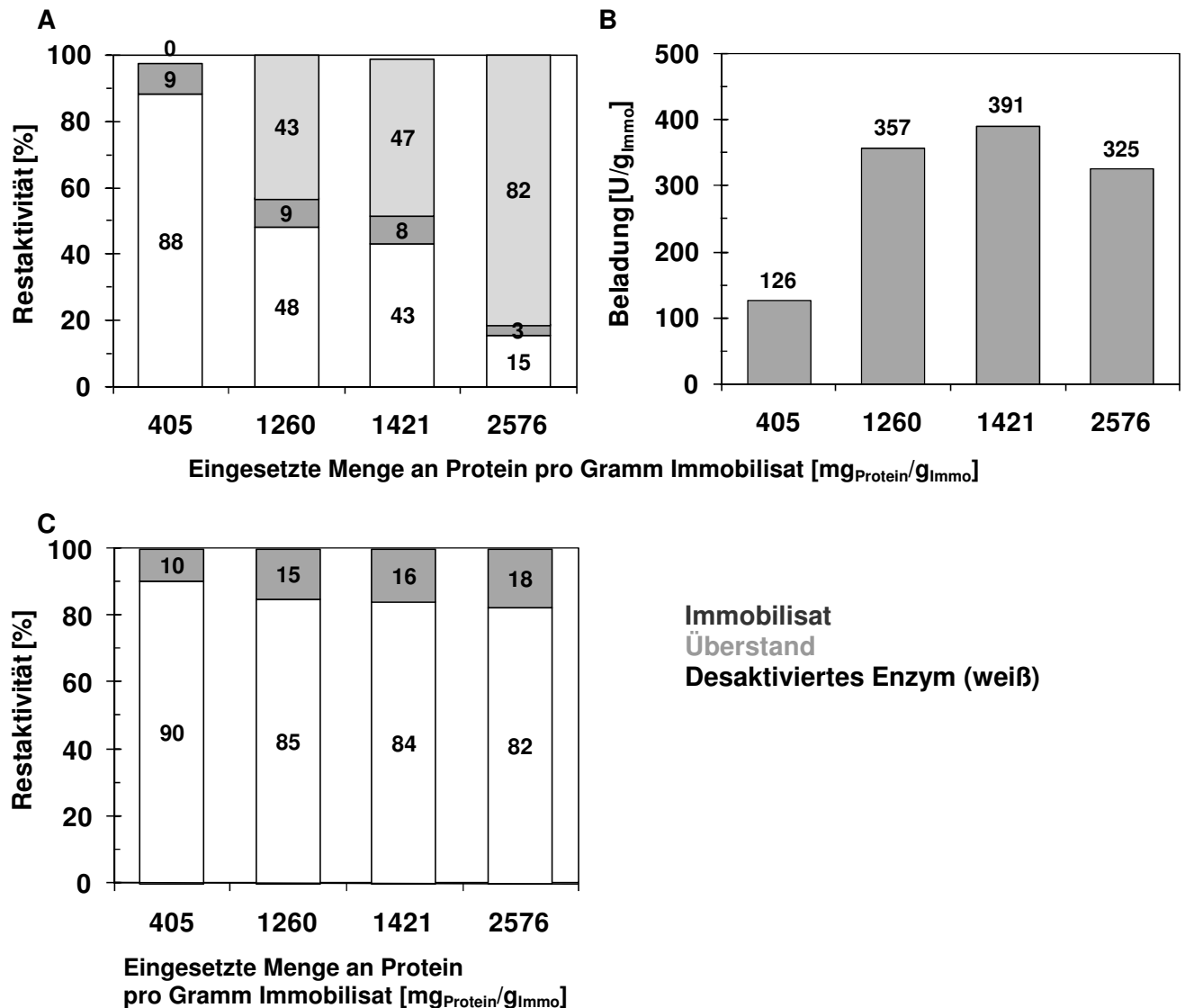


Abbildung 4-8:

A: Berechnung der Restaktivität  
B: Enzymbeladung des Immobilisates  
C: Berechnung der Restaktivität nach Formel 4-2

Die Wahrscheinlichkeit, dass die FDH von den reaktiven Gruppen der voraktivierten Chitosanflocken inaktiviert wird, steigt, je geringer die Menge an eingesetztem Protein im Vergleich zur Menge der voraktivierten Chitosanflocken ist. Eine weitere Steigerung der Enzymaktivität und der Restaktivität war nicht möglich, da bei höheren

Proteinkonzentrationen die Enzymaktivität im Überstand zunahm, da wahrscheinlich die Bindungskapazität der voraktivierten Chitosanflocken erschöpft war (s. Abbildung 4-8 B).

Da das im Überstand befindliche Enzym jedoch theoretisch wieder verwendet werden kann, wurde in Abbildung 4-8 die Restaktivität des Enzyms im Immobilisat berechnet, indem von der eingesetzten Enzymmenge die im Überstand befindliche Menge abgezogen wird. Die Berechnung ist in Formel 4-2 beschrieben. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-8 C dargestellt. Damit ergibt sich bei 2576 mg<sub>protein</sub>/g<sub>Immo</sub> eine Restaktivität von 18 %.

$$1 \quad RestEA_{immo} * [\%] = \frac{EA_{immo} [U]}{EA_{eingesetzt} [U] - (EA_{über} \left[ \frac{U}{ml} \right] * V_{gesamt} [ml])} * 100$$

$$2 \quad EA_{desakt} * [\%] = \frac{EA_{sus} \left[ \frac{U}{ml} \right] * V_{gesamt} [ml]}{EA_{eingesetzt} [U] - (EA_{über} \left[ \frac{U}{ml} \right] * V_{gesamt} [ml])}$$

Erläuterungen siehe Formel 4-1

---

Formel 4-2: Berechnung der Restaktivität im Immobilisat (1) und der desaktivierten Enzymmenge (2) unter Einberechnung der im Überstand verbliebenen Enzymmenge

---

Obwohl eine beachtliche Steigerung der Restaktivität und der Enzymbeladung des Immobilisates erreicht werden konnte, ist die Restaktivität mit deutlich unter 20 % für technische Anwendungen noch nicht ausreichend. Daher wird auf eine weitere Optimierung dieser Immobilisierungsmethode und auf die Anwendung anderer Immobilisierungsmethoden mit kovalenten Bindungen verzichtet, da die meisten chemischen Bindungen wie das Glutardialdehyd an die Aminogruppen erfolgen. Im Folgenden werden weitere Methoden der Immobilisierung untersucht, bei denen die FDH nicht einer kovalenten Bindung und damit einer chemischen Modifikation ausgesetzt ist.

#### 4.2.2 Ausflockung der FDH mit Polyelektrolyten

Eine Immobilisierungsmethode ist die Ausflockung von Enzymen, bei der das Enzym nicht kovalent an das Immobilisat gebunden wird, sondern die Bindung nur durch ionische, eventuell auch weitere physikalische, Wechselwirkungen der FDH an den Polyelektrolyten besteht (siehe Kapitel 2.5.1.2 und 2.5.2.3). Das mittels Polyelektrolyten ausgeflockte Enzym kann dann z.B. wieder in Hydrogele wie LentiKats® eingeschlossen werden. Dies wurde bereits von Czichocki et al. 2001 [22] erfolgreich mit der Amyloglucosidase praktiziert, welche mit den beiden Polyelektrolyten Polystyrensulfat und PDADMAC ausgeflockt wurde und die Immobilisate 45% der eingesetzten Aktivität besaßen. Gerade bei der FDH bietet

sich diese Methode an, da die FDH ihren Isoelektrischen Punkt bei pH 5,4 hat. Bei einem pH-Wert von 8,1, bei dem die FDH gemäß Kapitel 4.1.1.1 stabil ist, ist sie dementsprechend negativ geladen. Das bedeutet, dass die FDH bei einem pH-Wert von 8,1 mit Hilfe eines positiv geladenen, also kationischen Polyelektrolyten zu einem wasserunlöslichen Komplex ausgeflockt werden kann. Dies wird in Abbildung 4-9 vereinfacht verdeutlicht. Eine genaue Beschreibung der Bildung von Polyelektrolytkomplexen ist in Kapitel 2.5.2.3 gegeben.

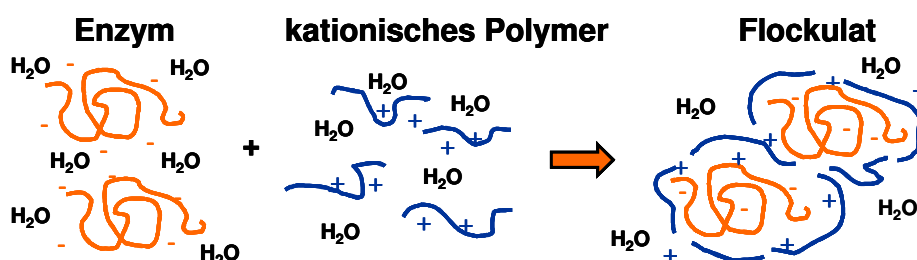


Abbildung 4-9: Vereinfachte Darstellung der Ausflockung der FDH

Der Flockungserfolg und die Bildung von Polyelektrolytkomplexen bei schwachen Polyelektrolyten mit niedriger Ladungsstärke und geringer Basen- und Säurenstärke wie bei Proteinen ist von den Fällungsbedingungen wie pH-Wert, Art der Zugabe, Menge der Zugabe und Art des Flockungssystems -Gefäßart, Mischzeit, Arbeitsvolumen- abhängig [126]. Für starke Polyelektrolyte korrespondiert der Flockungspunkt mit einer 1:1 Ladungsstöchiometrie, während mit abnehmender Ladungsdichte, schwächeren ionischen Gruppen und signifikanter sterischer Hinderung starke Abweichungen beobachtet werden. [25;108;139]. Es können darüber jedoch keine allgemeingültigen Vorhersagen gemacht werden. Daher wurden diese Parameter in Vorversuchen überprüft und die FDH gemäß Kapitel 3.2.4.1, Versuchsvorschrift Vorversuche, ausgeflockt. Die Temperatur war Raumtemperatur und der pH-Wert wurde in allen Fällen auf pH 8,1 eingestellt. Es wurde festgestellt, dass vor allem die Art und Menge der Zugabe entscheidend ist. Werden zu große Mengen an kationischem Flockungsmittel in einem einzigen Schritt dazugegeben, bildet sich kein Flockulat. Daraus ergab sich die Versuchsvorschrift für die Hauptversuche in gemäß Kapitel 3.2.4.1, Versuchsvorschrift Hauptversuche.

Entsprechend dieser Methode wurde die FDH mit verschiedenen Flockungsmitteln, welche in Tabelle 3.2 aufgelistet sind, ausgeflockt. Von der entstandenen Suspension und dem Überstand wurde die Enzymaktivität gemäß Kapitel 3.1.1.1, 3.1.1.3 und 3.1.1.4 die Enzymaktivität gemessen und die Restaktivität des Überstandes und der Suspension wie in Formel 3-2 (1) und (3) bestimmt. Die Restaktivität des Immobilisates ergab sich aus der

Differenz Restaktivität des Überstandes und der Suspension. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-10 dargestellt.

Daraus ist ersichtlich, dass sehr niedrig molekulare PDADMAC.522376 der Fa. Sigma-Aldrich mit einer Endkonzentration von  $0,036 \text{ mg}_{\text{PDADMAC}}/\text{mg}_{\text{FDH}}$  das am besten geeignete Flockungsmittel ist, dort werden über 40 % der FDH im Flockulat gebunden.

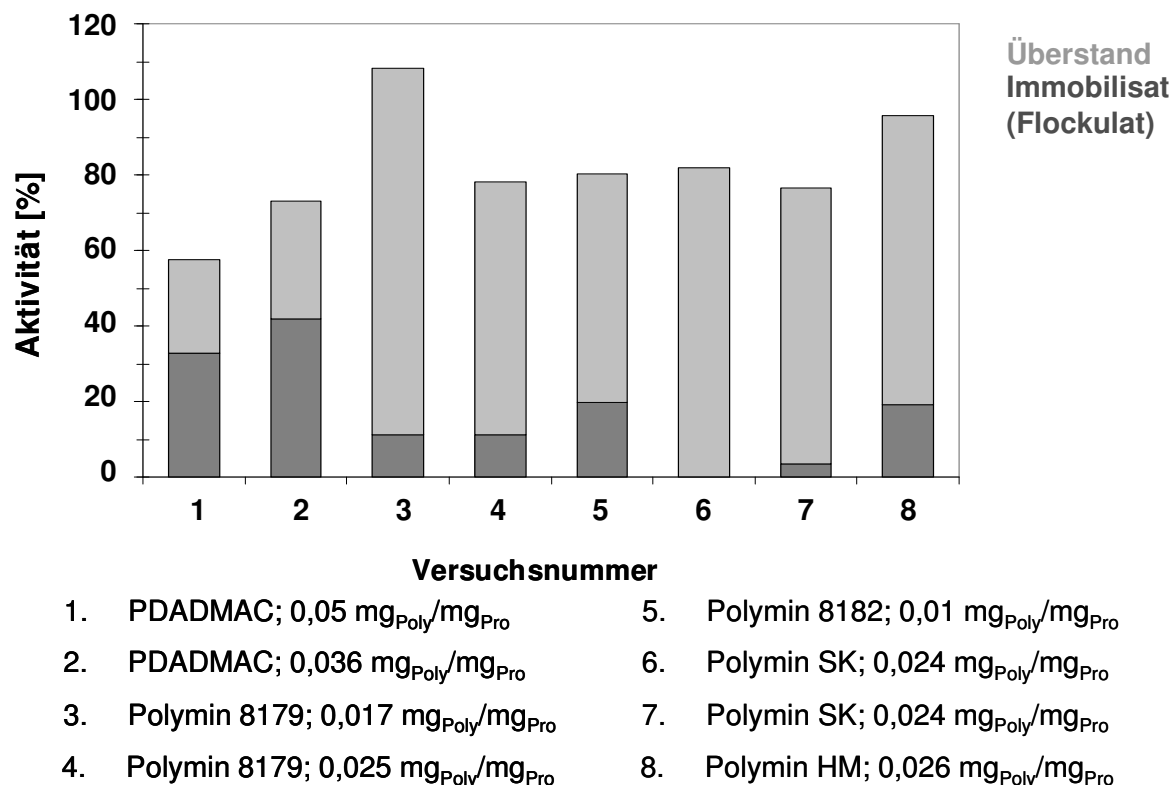


Abbildung 4-10: Ausflockung der FDH mit unterschiedlichen kationischen Flockungsmitteln und Berechnung der Restaktivitäten im Überstand und im Flockulat

Da manche Polyelektrolytkomplexe nicht stabil gegenüber Salzen sind und eine gute Löslichkeit besitzen [126], wurde als nächstes die Stabilität der Flocken gegenüber Kaliumphosphat und Natriumformiat, das Substrat der Enzymreaktion der FDH, überprüft. Die FDH wurde gemäß Kapitel 3.2.4.1, Versuchsvorschrift Hauptversuche, mit PDADMAC 522376 der Fa. Sigma-Aldrich ausgeflockt. Von der entstandenen Suspension wurde ein Teil gemäß Kapitel 3.2.4.1, Versuchsvorschrift Hauptversuche, abzentrifugiert, in 3 Teile aufgeteilt und 3fach mit entweder Wasser, 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,2 und 0,4 M Natriumformiatlösung pH 8,2 gewaschen. Von dem gewaschenen Pellet wurde jeweils gemäß Kapitel 3.1.1.5 die Enzymaktivität gemessen und mit Hilfe von Formel 3-2 die entsprechende Restaktivität [%] berechnet. Das Ergebnis ist Abbildung 4-11 zu sehen.



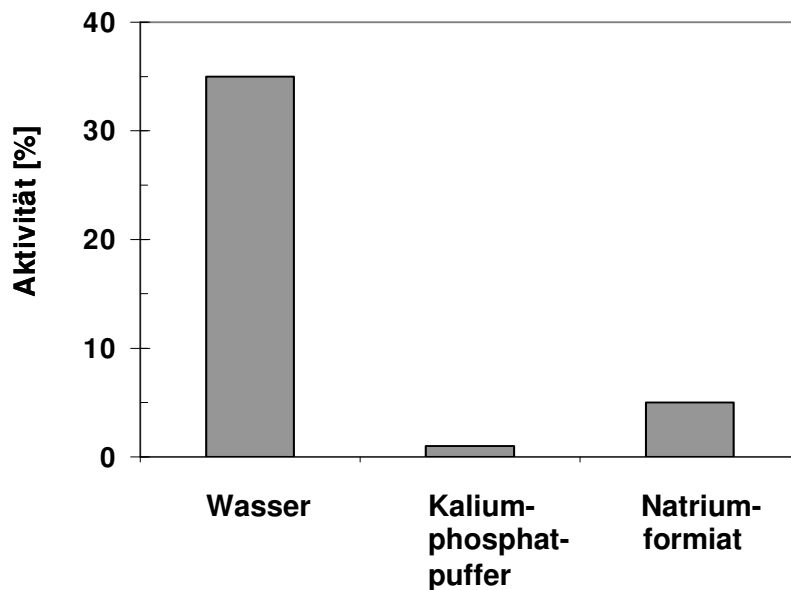


Abbildung 4-11: Stabilität des FDH-Flockulates in Wasser, Natriumformiat und Kaliumphosphatpuffer

Wie in Abbildung 4-11 zu sehen ist, ist bei den Flocken, die mit Kaliumphosphat und Natriumformiat gewaschen wurden, kaum Aktivität vorhanden und auch das gewaschene Pellet war nicht mehr sichtbar. Die Flocken lösen sich anscheinend in der Gegenwart dieser Salze auf. Daher wurde versucht, durch die zusätzliche Zugabe von anionischen Polyelektrolyten (s. Tabelle 3.2) die Flocken zu stabilisieren. Die Herstellung dieser Flocken erfolgte gemäß Kapitel 3.2.4.2 nach Methode 1 und Methode 2. Dabei stellte sich heraus, dass sich der beste Flockungserfolg nach Methode 2 im kleinen Becherglas einstellte. Cellulosesulphat erwies sich als bestes anionisches Polyelektrolyt und erbrachte Flocken mit einer Restaktivität von 54 % der eingesetzten FDH. Leider waren sich auch diese Flocken nicht stabil gegenüber Kaliumphosphat und Natriumformiat. Die Flocken bleiben mit den Polyelektrolyten PDADMAC und Cellulosesulfat zwar erhalten, die FDH wurde jedoch herausgewaschen. Dies kann daran liegen, dass die FDH als Protein nur ein schwacher Polyelektrolyt ist, der nur eine geringe Ladungsdichte und schwache ionische Gruppen (Aminogruppen) besitzt.

Da diese Methode aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse auch nicht als Immobilisierungsmethoden der FDH geeignet war, wurde im Folgenden nach weiteren Methoden gesucht.

#### 4.2.3 Verkapselung der FDH in Polyelektrolythohlkugeln

Als eine sanfte Methode der Immobilisierung gilt die Verkapselung von biologischem Material in Hohlkugeln. Allerdings haben Hohlkugeln häufig die Nachteile, dass die Herstellung

mehrere Schritte benötigt und die Hohlkugeln eine relativ große Porengröße aufweisen, welche zwar Zellen zurückhalten, durch die aber kleinere Stoffe wie Enzyme hindurchdiffundieren können. Weiterhin sind viele Hohlkugeln empfindlich gegenüber Salzen und bestimmten pH-Werten.

Als für die FDH am geeignetsten erscheint eine Verkapselung in Hohlkugeln aus den Polyelektrolyten PDADMAC und Cellulosesulfat, wie sie in Kapitel 2.5.2.3. erläutert ist. Diese Verkapselungsmethode wurde von Dautzenberg et al. eingehend untersucht.

- Vorteile dieser Hohlkugeln:
- geringe Porengröße einstellbar: cut-off ist kleiner als 74000 kDa, daher ist für die FDH keine Molekulargewichtsvergrößerung notwendig [32]
  - gute Biokompatibilität der Polyelektrolyte
  - einfache Herstellung der Hohlkugeln durch eine ein-Schritt-Immobilisierung
  - gute Abtrennbarkeit der Immobilisate
  - sanfte Immobilisierungsmethode, bei der für die FDH günstige Bedingungen (Temperatur, pH-Wert) eingestellt werden können
  - durch flüssigen Kern kein Eingriff in die Struktur der FDH  
=> kein Aktivitätsverlust der FDH zu erwarten

Im Folgenden wurde zunächst in Vorversuchen die Wirkung der Polyelektrolyte PDADMAC und CS auf die FDH sowie Parameter zur Kapselbildung untersucht.

#### **4.2.3.1 Langzeitaktivität der FDH in den Polyelektrolytlösungen Cellulosesulfat und PDADMAC**

Um die Biokompatibilität der Polyelektrolyte auf die FDH festzustellen, wurde die Stabilität der FDH in dem Polyelektrolyte Cellulosesulfat bei unterschiedlichen Temperaturen und pH-Werten überprüft. Dazu wurde das Cellulosesulfat mit Hilfe von NaOH auf einen pH-Wert von ~ 8 eingestellt und mit 10 U/g<sub>CS</sub> FDH versetzt. Jeweils ein Aliquot wurde bei Raumtemperatur (25 °C) und bei 4 °C inkubiert und in regelmäßigen Abständen die verbleibende Aktivität der FDH gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.3 gemessen. Zur Untersuchung der Langzeitaktivität der FDH bei unterschiedlichen pH-Werten des Cellulosesulfates wurde das CS mit Hilfe von Kaliumphosphatpuffer (Endkonzentration des KPi-Puffers im CS: 50 mM) auf die pH-Werte 5,9; 7,0 und 8,2 eingestellt, mit 10 U/g<sub>CS</sub> FDH versetzt, bei Raumtemperatur inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen die Aktivität der FDH gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.3 gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-12 dargestellt. Wie dort zu sehen ist, führt weder

Raumtemperatur noch ein pH-Wert von 5,9 des Cellulosesulfates zu einer signifikanten Inaktivierung der FDH. Das bedeutet, dass das Cellulosesulfat als Verkapselungsmaterial für die FDH grundsätzlich geeignet ist.

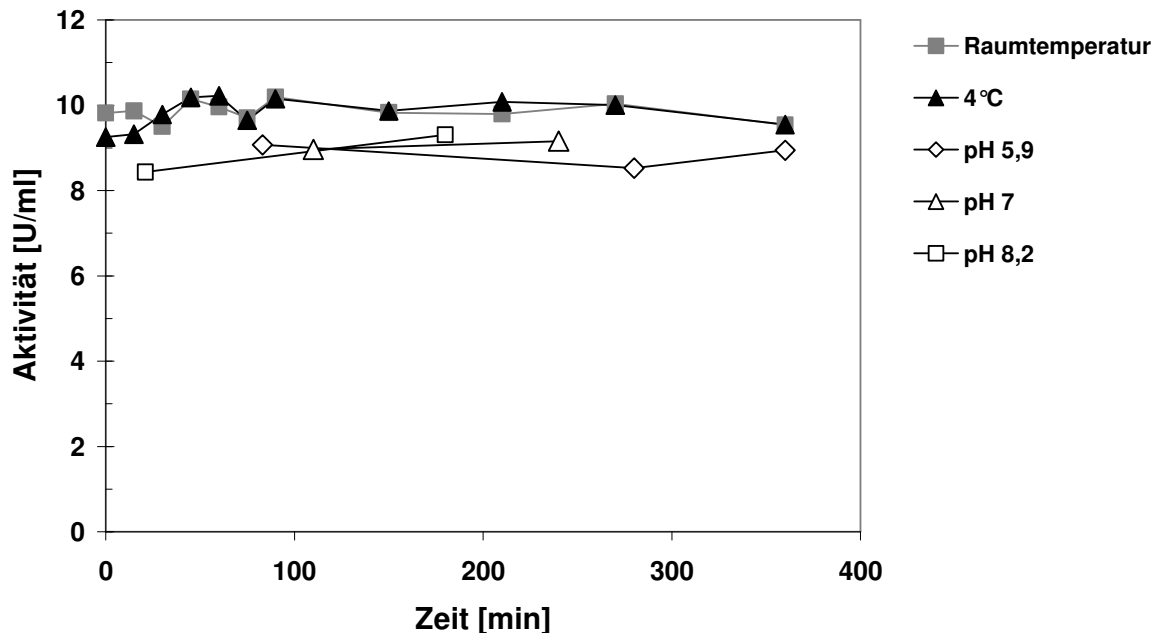


Abbildung 4-12: Langzeitaktivität der FDH in Cellulosesulfat

In einem weiteren Versuch wurde die Langzeitaktivität der FDH in PDADMAC über einen Zeitraum von 1000 min getestet. Dabei wurde festgestellt, dass bei einem pH-Wert des PDADMAC's von 6 die Aktivität nur bei 4°C erhalten bleibt, bei 25 °C verliert die FDH ca. 40 % ihrer Aktivität. Das bedeutet, dass für eine Bestimmung der FDH im PDADMAC dieses nur bei 4°C aufbewahrt werden darf. Für den Herstellungsprozess hat dieses keinerlei Auswirkung, da die FDH in den Hohlkugeln keinen direkten Kontakt mit dem PDADMAC hat.

#### 4.2.3.2 Herstellung von Polyelektrolythohlkugeln mit FDH

Um zu sehen, ob sich die Hohlkugeln zur Verkapselung der FDH eignen, wurde die FDH zunächst ohne Kapseloptimierung unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen mit der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methode verkapselt, um festzustellen, ob diese Methode für die FDH grundsätzlich geeignet ist. Die einzelnen Verkapselungsbedingungen sind in Tabelle 3-1 aufgelistet.

Die hierbei erhaltenen Kugeln wurden gemäß Kapitel 3.1.1.5 auf ihre Enzymaktivität hin gemessen und die Restaktivität entsprechend Formel 3-3 A und B berechnet. Wie in Abbildung 4-13 zu sehen ist, wurde eine Restaktivität von 23,4 % (siehe 1. Einsatz) erreicht.

Da dies die höchste Restaktivität ist, die bisher erreicht wurde, wurde der Mehrfacheinsatz der Kugeln über 8 Tage in insgesamt 17 Einsätzen von jeweils 1 Stunde untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-13 zu sehen.

In den ersten 3 Einsätzen fiel die Restaktivität um über 30 % auf ungefähr 15 % ab. Danach fiel die Restaktivität der FDH nur noch leicht in weiteren 14 Einsätzen in 7 Tagen auf ca. 12 %. Dieser Aktivitätsverlust wird im Folgenden weiter untersucht (siehe Kapitel 4.2.3.3).

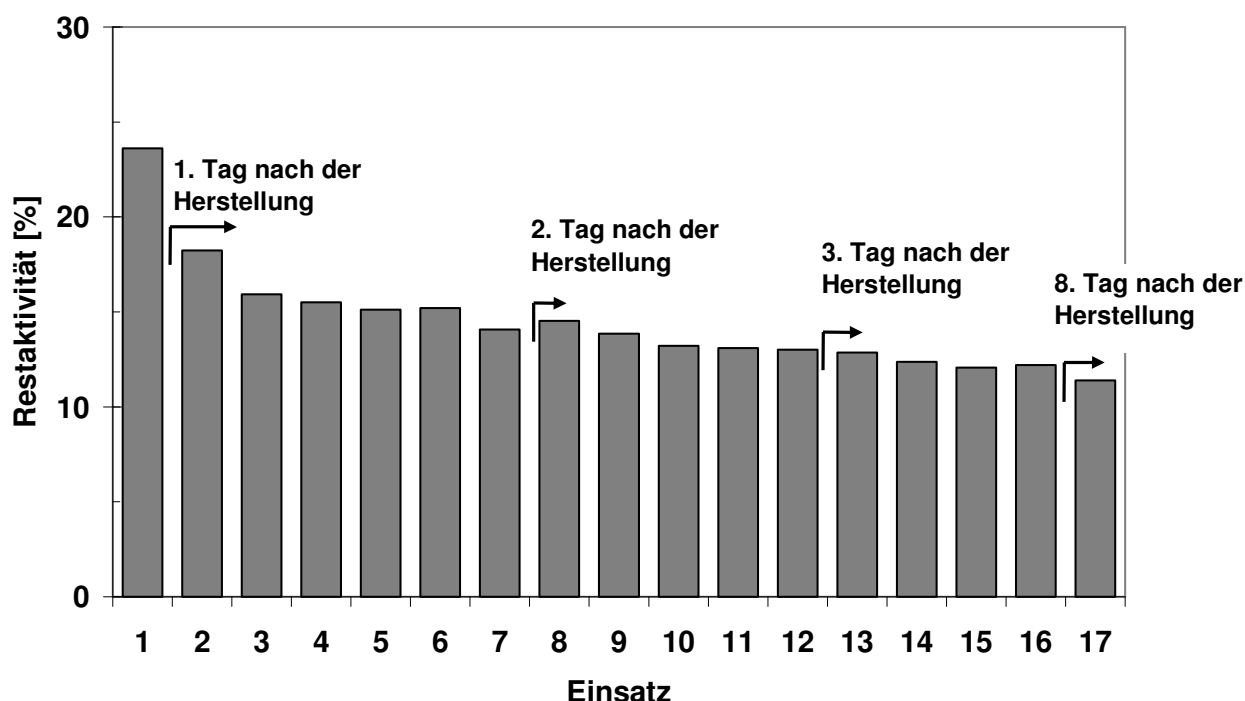


Abbildung 4-13: Restaktivität und Mehrereinsatz der Polyelektrolythohlkugeln

Die Verkapselung in CS/PDADMAC-Hohlkugeln stellt die bisher beste Immobilisierungsmethode dar und wird daher in weiteren Versuchen untersucht und optimiert.

#### 4.2.3.3 Untersuchung zum Enzymverlust während des Mehrfacheinsatzes

Hierbei wurde untersucht, ob der Verlust an Enzymaktivität in den ersten 3 Versuchen mit der Diffusion der FDH aus der Hohlkugel zusammenhängt oder durch eine Inaktivierung der FDH zustande kommt. Dazu wurden Kugeln gemäß Kapitel 3.2.1 hergestellt, die Enzymaktivität eines definierten Aliquots der Kugeln gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.5 gemessen und die Restenzymaktivität der Kugeln entsprechend der Formel 3-3 A und B berechnet. Diese Kugeln wurden in einer Lösung (0,4 M Formiat, 0,05 mM

Kaliumphosphatpuffer, pH 8,2) bei 4°C mit einem KPG-Rührer gerührt. Nach 91 Stunden wurden erneut die Enzymaktivität der Kugeln gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.5 sowie die Enzymaktivität der Lösung gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.3 gemessen. Daraus wurde erneut die Restenzymaktivität der Kugeln entsprechend der Formel 3-3 A und B sowie die in die Lösung diffundierte Enzymmenge in % (= Enzymverlust) gemäß Formel 4-3 berechnet.

$$EA_{\text{eingesetzt}} [U] = EA_{\text{Kugeln eingesetzt}} * m_{\text{Kugeln eingesetzt}} [g]$$

$$Enzymverlust [\%] = \frac{EA_{\text{Lösung}} \left[ \frac{U}{ml} \right] * V_{\text{Lösung}} [ml]}{EA_{\text{eingesetzt}} [U]} * 100$$

$EA_{\text{eingesetzt}}$ : gesamte eingesetzte EA  
 $EA_{\text{Kugeln eingesetzt}}$ : in den Kugeln eingesetzte EA  
 $m_{\text{Kugeln eingesetzt}}$ : Menge der eingesetzten Kugeln  
 $EA_{\text{Lösung}}$ : EA der Lösung nach 91 h bzw. zu bestimmten Zeitpunkten  
 $V_{\text{Lösung}}$ : Volumen der Lösung

Formel 4-3: Berechnung des Enzymverlustes

Das Ergebnis ist in Abbildung 4-14 dargestellt.



Abbildung 4-14: Enzymverlust der Polyelektrolythohlkugeln in das umgebene Medium

Wie in Abbildung 4-14 zu sehen, ist ein großer Teil der FDH, der in den Hohlkugeln verloren gegangen ist, in das ausliegende Medium diffundiert und nicht während des Rührprozesses inaktiviert worden. Daher ist eine weitere Optimierung dieser Immobilisate in Bezug auf den Mehrfacheinsatz und in Bezug auf die verbleibende Restaktivität notwendig.

#### 4.2.3.4 Untersuchungen an mit FDH beladenen Hohlkugeln

Eine weitere Möglichkeit, welche zu einer verminderten Aktivität der FDH in den Hohlkugeln führen könnte, ist eine temporäre Inaktivierung der FDH durch die Polyelektrolyte. Da FDH bei pH 8,2 negativ geladen ist, diffundiert sie ebenfalls während des Verkapselungsprozesses - wie das negativ geladene Cellulosesulfat - in die Richtung der

Kapselmembran. Möglicherweise liegt die FDH an oder in der Kapselmembran zusammen mit dem Polyelektrolyten PDADMAC als wasserunlöslicher Komplex vor, welcher in seiner Enzymaktivität eingeschränkt ist. Dies soll in einem Experiment, in dem mit FDH beladene Hohlkugeln untersucht werden, überprüft werden. Dazu werden 4 Aliquots Hohlkugeln gemäß den Bedingungen in Kapitel 3.2.1 und Tabelle 3-1 hergestellt, in Wasser aufbewahrt und wie in Tabelle 4-1 beschrieben behandelt.

Tabelle 4-1: Versuchsbedingungen zur Untersuchung der Lage der FDH in den Hohlkugeln

| 1  | 2  | 3   | 4  |
|--|--|---|--|
| Messung der Enzymaktivität von den intakten Kugeln<br>⇒ <b>Restaktivität der intakten Kugeln [%]</b> | Zerdrücken der Kugeln, 3 * Waschen mit je 500 µl H <sub>2</sub> O, Messung der Enzymaktivität<br>⇒ <b>Restaktivität des Kugelinneren [%]</b> | Zerdrücken der Kugeln, 3 * Waschen mit je 500 µl H <sub>2</sub> O, Messung der Enzymaktivität<br>⇒ <b>Restaktivität des Kugelinneren [%]</b>              | Zerdrücken der Kugeln, 3 * Waschen mit je 500 µl 50 mM Kpi-Puffer, Messung der Enzymaktivität<br>⇒ <b>Restaktivität des Kugelinneren [%]</b> |
|  | Messung der Enzymaktivität der verbliebenen Kugelhüllen<br>⇒ <b>Restaktivität der Kugelhüllen [%]</b>  | Inkubieren der verblieben Kugelhüllen in 50 mM Kpi-Puffer, danach Messung der Enzymaktivität mit KPi-Puffer<br>⇒ <b>Restaktivität der Kugelhüllen [%]</b> | Messung der Enzymaktivität der verbliebenen Kugelhüllen<br>⇒ <b>Restaktivität der Kugelhüllen [%]</b>  |

Die Messung der intakten Kugeln und die Berechnung der Restaktivität erfolgt gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.5 und Formel 3-4 A und B. Die Enzymmessung der Waschlösungen in Versuch 2-4 erfolgte entsprechend Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.3.

Die Berechnung der Restaktivität des Kugelinneren erfolgte nach Formel 4-4. Die Enzymaktivität der Kugelhüllen in Versuch 2-4 wurde wieder gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.5 gemessen und die Restaktivität nach Formel 3-4 berechnet. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 4-15 dargestellt.

$$EA_{\text{eingesetzt}} [U] = \frac{EA_{CS} [U/g] * (m_{\text{eingetropftesCS}} [g] - m_{\text{Spritzverluste}} [g])}{m_{\text{Kugeln gesamt}} [g]} * m_{\text{Kugeln eingesetzt}}$$

$$RestEA_{Kuginn} [\%] = \frac{EA_{Kuginn} [U/ml] * V_{\text{gesamtKuginn}} [ml]}{EA_{\text{eingesetzt}} [U]} * 100$$

$EA_{\text{eingesetzt}}$ : EA/  
 $RestEA_{Kuginn}$ : RestEA<sub>Kuginn</sub>:  
 $V_{\text{gesamtKuginn}}$ : EA/RestEA des Kugelinneren  
Gesamtvolumen der Waschflüssigkeit / des Kugelinneren  
eingesetzte EA

Formel 4-4: Berechnung der Restaktivität des Kugelinneren

Bei einem Vergleich von Versuch 1 und 4 ist zu erkennen, dass die FDH, obwohl die intakten Kugeln nur 17 % der eingesetzten Enzymaktivität besitzen, während der Verkapselung nicht inaktiviert wurde, da in Versuch 4 95 % der eingesetzten Enzymaktivität wieder gefunden werden konnte.

Interessant bei dem Vergleich der Versuche 2 und 3 mit Versuch 4 ist, dass im Kugelinneren nur dann aktive FDH gefunden werden kann, wenn die Kapselhüllen mit Kaliumphosphatpuffer gewaschen werden.

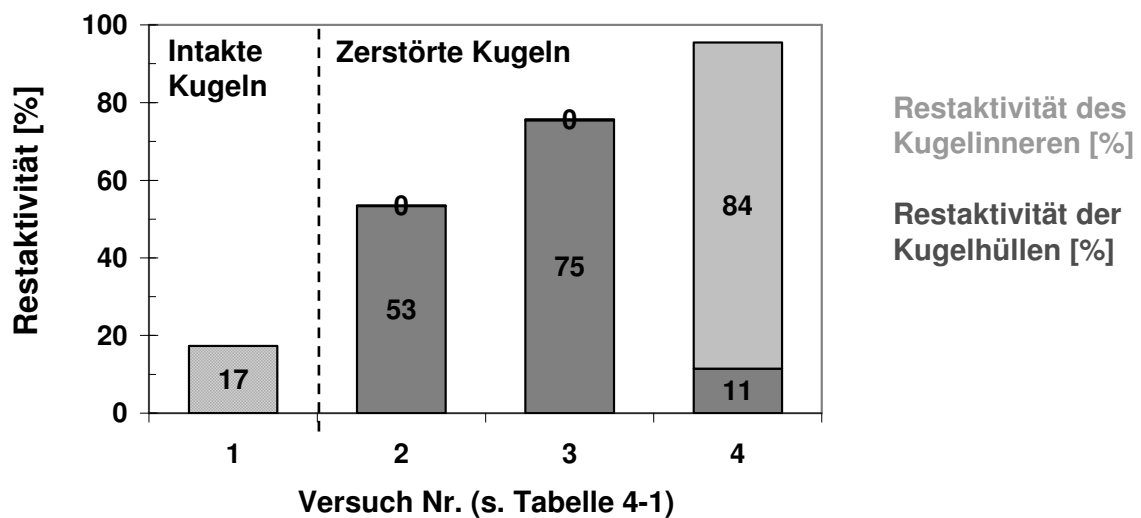


Abbildung 4-15: Restaktivitäten der FDH in den intakten Kugeln, den Kapselhüllen und im Kugelinneren, Versuch 1-4 entsprechend Tabelle 4-1

Möglicherweise ist es so, dass die FDH durch den positivgeladenen Polyelektrolyten PDADMAC an die Kapselwand wandert und dort einen Polyelektrolytkomplex bildet, welcher durch die ionischen Wechselwirkungen fest mit der Kapselwand verbunden ist. Dies bewirkt, dass sich im Inneren der Kugel keine FDH mehr befindet und dass sich bei dem Waschvorgang mit Wasser die FDH nicht von der Kapselwand löst. Dadurch wird nur in der Kapselmembran Aktivität der FDH gemessen. Werden die zerdrückten Kugeln dagegen mit Kaliumphosphatpuffer gewaschen, löst das darin enthaltene Phosphat den Polyelektrolytkomplex auf und wäscht die FDH in die Lösung. Damit liegt die FDH nicht mehr als Polyelektrolytkomplex an der Kapselmembran vor, sondern in gelöster Form im Kaliumphosphatpuffer. Die Enzymaktivität steigt dort auf 84 % der eingesetzten Aktivität an. Die restlichen 11 %, die mit der Kapselhülle gemessen werden, befinden sich wahrscheinlich fest eingebunden in der Kapselmembran. Diese Theorie ist noch einmal in Abbildung 4-16 verdeutlicht.

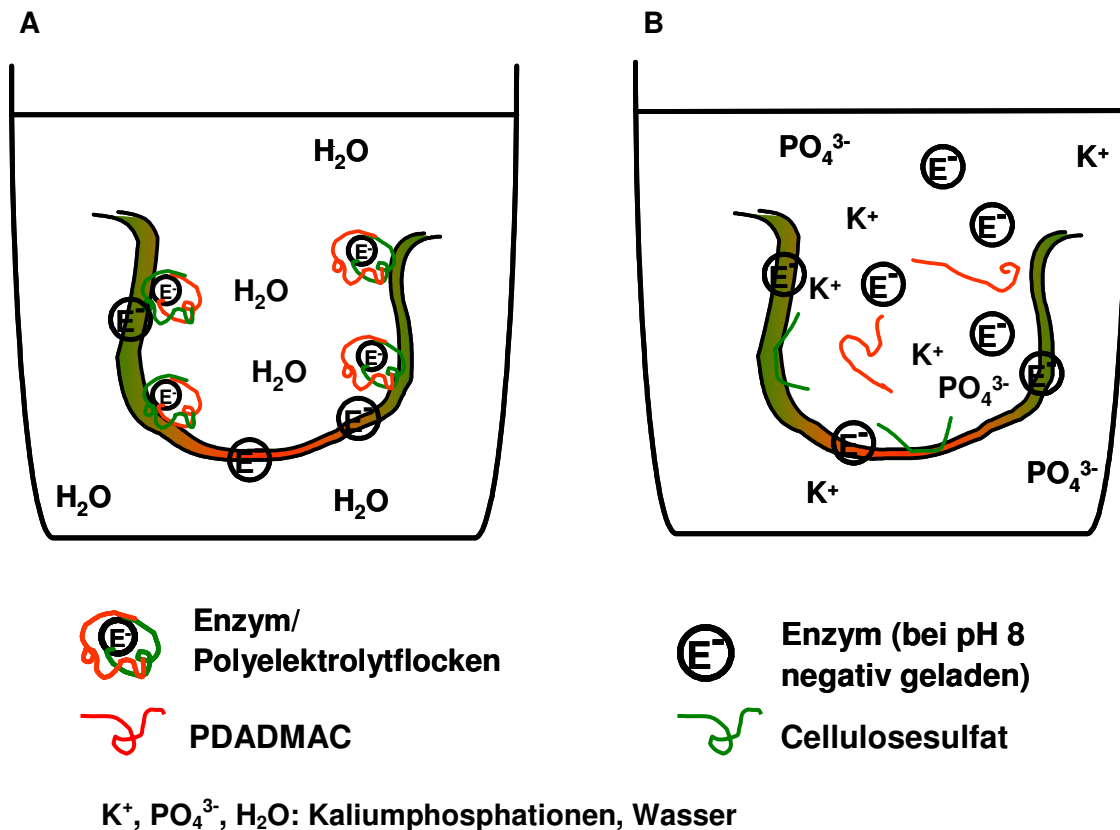


Abbildung 4-16: Mögliche Lage der FDH in den zerstörten Hohlkugeln, mit Wasser gewaschen (A) und mit Kaliumphosphatpuffer gewaschen (B)

Die Tatsache, dass in Versuch 2 und 3 jeweils nur 53% bzw. 75 % der eingesetzten Aktivität in der Kapselmembran wieder gefunden wird, lässt sich dadurch erklären, dass die FDH durch die Polyelektrolyte an der Kapselwand temporär inaktiviert wird. Da die Enzymmessung der FDH in einem Medium mit Salzen wie Kaliumphosphat stattfindet, löst sich sofort am Start der Messung einiges der FDH von den Polyelektrolyten und ist aktiv. Daher ist die Restaktivität nicht 0 %. Wird die Kapselmembran, wie in Versuch 3, vorher eine Zeit lang in 50 mM Kaliumphosphatpuffer inkubiert, steigt die Restaktivität der Kapselhülle auf 75 % an. Bei längerer Inkubationszeit würde sie wahrscheinlich auf 100 % ansteigen.

Aufgrund dieser Beobachtungen besteht die Möglichkeit, dass die geringe Restaktivität der Immobilisate auch durch diese temporäre Inaktivierung der FDH hervorgerufen wird, da es nicht sicher ist, ob die im Reaktionsmedium und der Aufbewahrungslösung enthaltene Kaliumphosphatmenge ausreicht, um alle FDH/Polyelektrolytkomplexe aufzulösen. Daher wurde in entsprechenden Vorversuchen untersucht, ob durch eine Inkubation der Kugeln in höheren Kaliumphosphatpufferkonzentrationen und eine Erhöhung der Konzentration an Kaliumphosphatpuffer im Reaktionsmedium die Restaktivität der Kugeln zu erhöhen. Dies



jedoch gelang nicht (Experimente hier nicht beschrieben). Anscheinend reicht die im Reaktionsmedium und der Aufbewahrungslösung enthaltende Kaliumphosphatmenge aus und es liegt keine Inaktivierung der FDH in den Kapseln vor.

Das Enzym, welches in die Kapselmembran wandert, birgt jedoch das Risiko, dass es bei einem Mehrfacheinsatz der Immobilisate herausgelöst werden kann und damit Löcher in der Membran entstehen, durch welche die FDH aus der Kugel in das umgebene Medium hinaus diffundieren kann. Das kann einen Aktivitätsverlust im Mehrfacheinsatz zur Folge haben.

#### **4.2.3.5 Unterschiedliche NAD-Konzentrationen**

Ein großes Problem bei der Verwendung von immobilisierten Biokatalysatoren stellt häufig die Diffusionslimitierung von Produkten und Substraten in das Immobilisat dar. Dies ist gerade auch bei größeren Immobilisaten der Fall. Dies soll nun auch in diesem Fall untersucht werden. Dabei soll der Einfluss der NAD-Konzentration näher untersucht werden, da dies wahrscheinlich am ehesten der limitierende Faktor ist. NAD/NADH sind einerseits im Vergleich zu den anderen Substraten sehr große Moleküle, was sich erschwerend auf die Diffusion durch die Membran auswirken kann. Außerdem liegt das Coenzym NAD aufgrund seines hohen Preises in einer nur geringen Konzentration von 2 mM vor. Das Substrat Formiat ist relativ klein und liegt mit 0,4 M in einer hohen Konzentration vor, so dass davon ausgegangen wird, dass für dieses Substrat keine Diffusionslimitierung vorliegt.

Um den Einfluss der NAD-Konzentration auf die Enzymaktivität der in den Hohlkugeln vorhandenen FDH zu überprüfen, wurde die Enzymaktivität der Hohlkugeln bei unterschiedlichen NAD-Konzentrationen gemessen. Die Hohlkugeln wurden entsprechend Kapitel 3.2.1 und Tabelle 3-1 hergestellt und die Enzymaktivität gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.5 gemessen. Die in Kapitel 3.1.1.1 angegebene NAD-Konzentration wurde dabei zwischen 2-8 mM variiert. Die Enzymaktivität wurde wieder in Restenzymaktivität gemäß Formel 3-3 umgerechnet. Die Aktivität des freien Enzyms wurde gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.3, wobei auch hier die in Kapitel 3.1.1.1 angegebene NAD-Konzentration zwischen 0,025 und 8 mM variiert wurde (s.u.). Das Ergebnis ist in Abbildung 4-17 dargestellt. Dort ist wie vermutet zu sehen, dass eine Erhöhung der NAD-Konzentration eine Erhöhung der Enzymaktivität zur Folge hat.

Um einen Vergleich mit dem freien Enzym zu haben, wurde unter den hier verwendeten Bedingungen (s. Kapitel 3.1.1.1) der  $K_m$ -Wert für die freie FDH bestimmt. Die in der Literatur angegebenen  $K_m$ -Werte für NAD wurden unter anderen Bedingungen als den hier benutzten gemessen [6;74;75;149;153;174;175].

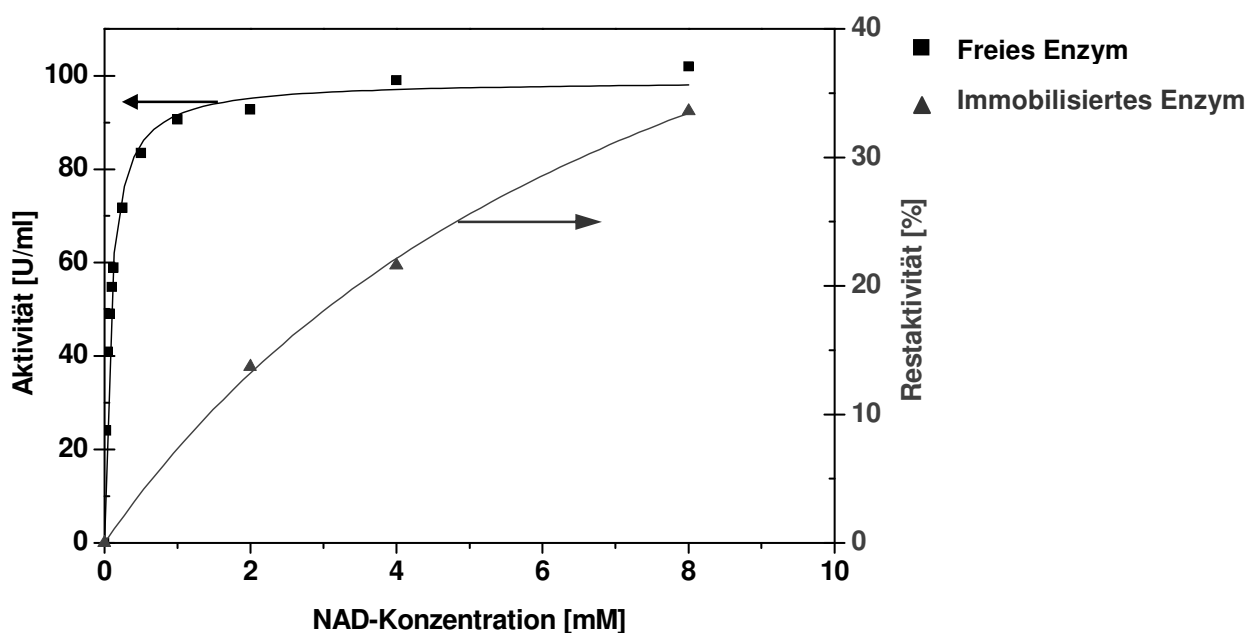


Abbildung 4-17: Abhängigkeit der Enzymaktivität der FDH (frei und immobilisiert) von unterschiedlichen NAD-Konzentrationen

Die NAD-Konzentration wurde im Bereich von 0,025 und 8 mM variiert und die resultierende Enzymaktivität gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.3 gemessen. Die Konzentration des Natriumformiates lag mit 400 mM 30fach über dem in der Literatur angegebenen  $K_m$ -Wert von 13 mM [145]. Die Werte wurden in ein entsprechendes Diagramm eingetragen und der  $K_m$ -Wert durch eine iterative Angleichung der Kurve an die Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt (s. Abbildung 4-18). Der  $K_m$ -Wert wurde zu 0,08 mM berechnet und liegt damit im Bereich der in der Literatur angegebenen Werten von 0,04 -0,3 mM (siehe Tabelle 5-2).

In Abbildung 4-17 ist weiterhin festzustellen, dass eine Erhöhung der NAD-Konzentration bei freier FDH über eine Konzentration von 2 mM hinaus im Gegensatz zur verkapselten FDH keine Erhöhung der Enzymaktivität zur Folge hat. Dagegen steigt Aktivität der verkapselten FDH bei einer Erhöhung der NAD-Konzentration von 2 mM auf 8 mM um den Faktor 2,3. Das lässt darauf schließen, dass es sich bei den Hohlkugeln tatsächlich um eine Diffusionslimitierung durch das NAD handelt.

Da diese mögliche Diffusionslimitierung durch eine Parallelverkapselung der FDH mit der LeuDH behoben werden kann, wird auf eine weitere Untersuchung hierzu verzichtet. In der Parallelverkapselung wird das von der FDH verbrauchte NAD direkt in der Kapsel von der LeuDH wieder regeneriert (siehe Kapitel 4.4).

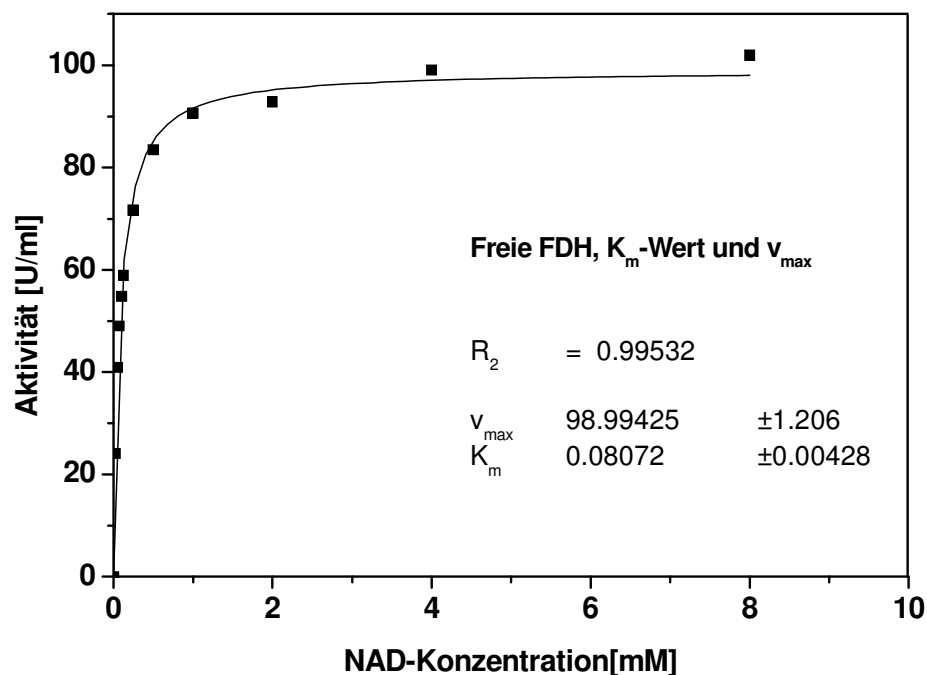


Abbildung 4-18: Berechnung des  $K_m$ -Wertes und von  $v_{max}$  für die freie FDH

#### 4.2.3.6 Untersuchung verschiedener Parameter zur Kapselbildung

Wie in Kapitel 4.2.3.1 bis 4.2.3.5 gezeigt werden konnte, stellt die Verkapselung der FDH in Polyelektrolythohlkugeln von allen in dieser Arbeit untersuchten Immobilisierungsmethoden die beste Variante dar. Es erscheint deshalb viel versprechend, die Verkapselung in Polyelektrolythohlkugeln für die FDH weiter zu optimieren und später ihre Anwendbarkeit zur Immobilisierung der LeuDH zu ermitteln. Da die Kapselbildung und die daraus resultierenden Kapseleigenschaften einen wesentlichen Einfluss auf die Güte der Immobilisierung besitzen, wurde sie, wie im Folgenden beschrieben, untersucht.

Wie in verschiedenen Literaturquellen [29-32;97] berichtet wird, ist die Bildung von Polyelektrolythohlkugeln von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Dies sind zum einen mechanische Umstände, wie z. B. der obere und seitliche Abblasdruck und der Abstand der Kanüle zur Aushärtungsflüssigkeit, wodurch die Kugelgröße und die Kugelform bestimmt werden können. Auch die Rührgeschwindigkeit während der Vernetzung, die Vernetzungsdauer sowie die Konzentration der Polyelektrolyte können einen Einfluss auf die Bildung der Hohlkugeln haben.

Daher werden im Folgenden verschiedene dieser Parameter in Hinblick auf die resultierende Kapselform, die Restenzymaktivität und die Stabilität der Immobilisate im Mehrfacheinsatz getestet. Dabei waren folgende Effekte festzustellen:

**1. seitlicher Abblasdruck / Eintropfhöhe:**

Dieses hat wie vermutet einen direkten Einfluss auf die Kapselgröße und -form. Je stärker der seitliche Abblasdruck ist, desto kleiner werden die Kapseln. Ab einem bestimmten Druck allerdings zerschlagen die Tropfen auf der Oberfläche des PDADMAC's oder werden zerrissen. Die Einstellung der richtigen Eintropfhöhe ist wichtig für die Form der Kugeln.

**2. Konzentration PDADMAC / Vernetzungsdauer**

Bei höherer PDADMAC-Konzentration bewirkt eine längere Vernetzungszeit eine sehr starke Schrumpfung der Kugeln, die nicht mehr rückgängig zu machen ist. Die Schrumpfung, die hierbei ebenfalls aufgrund des osmotischen Gefälles stattfindet, ist möglicherweise so stark, dass sich gegenüberliegende Seiten des Kapselinneren berühren und verkleben. Durch eine Erniedrigung der PDADMAC-Konzentration entstehen zwar rundere Kugeln, die eine längere Vernetzungsdauer tolerieren, diese jedoch sind instabiler und verlieren im Mehrfacheinsatz relativ viel Aktivität. Allein die Änderung der PDADMAC-Konzentration scheint nicht zu reichen, um runde und stabile Kugeln herzustellen. Es muß auch die CS-Konzentration geändert werden (siehe Kapitel 4.4.2).

**4.3 Immobilisierung der LeuDH**

Da sich herausgestellt hat, dass die beste Immobilisierungsmethode für die FDH die Verkapselung in die Polyelektrolyten PDADMAC und Cellulosesulfat ist (siehe Kapitel 4.2.3), wurde diese Methode für die Immobilisierung beider Enzyme genommen und zunächst die LeuDH alleine in diese Hohlkugeln eingeschlossen. Dazu wurde als erstes die Langzeitaktivität der LeuDH in den Polyelektrolyten getestet.

**4.3.1 Langzeitaktivität der freien LeuDH in CS**

Um zu testen, ob die LeuDH in den Polyelektrolyten CS und PDADMAC stabil ist, wurde 3 %iges CS mit einer definierten Menge an LeuDH versetzt. Der pH-Wert wurde mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer auf pH 5,9 und 8,2 eingestellt. Die erhaltenen Lösungen wurden jeweils bei 25 °C für ca. 150 min inkubiert. Die verbliebene Enzymaktivität wurde gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.3 gemessen und mit der eingesetzten Enzymaktivität verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei einem pH-Wert von 8,2 nur eine geringe Inaktivierung der LeuDH von 15 % und bei einem pH-Wert von 5,9 keine Inaktivierung durch das CS zuerkennen ist. Somit ist das Cellulosesulfat auch für die LeuDH biokompatibel.

### 4.3.2 Verkapselung der LeuDH in Polyelektrolythohlkugeln

Die LeuDH wurde gemäß Kapitel 3.2.1 und Tabelle 3-1 in Polyelektrolythohlkugeln eingeschlossen. Von der eingeschlossenen LeuDH wurde die Enzymaktivität gemäß Kapitel 3.1.1.2 und 3.1.1.5 gemessen und die Restaktivität im Vergleich zum eingesetzten Enzym gemäß Formel 3-4 A und B berechnet. Ein definiertes Aliquot der Kugeln wurde dann im Mehrfacheinsatz getestet. Die Enzymaktivität und die Restaktivität wurde jeweils wie oben ermittelt und das Medium wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben gewechselt, wobei die Waschlösung in diesem Fall auf 50 mM KPi-Puffer, pH 8,2 bestand. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-19 dargestellt.

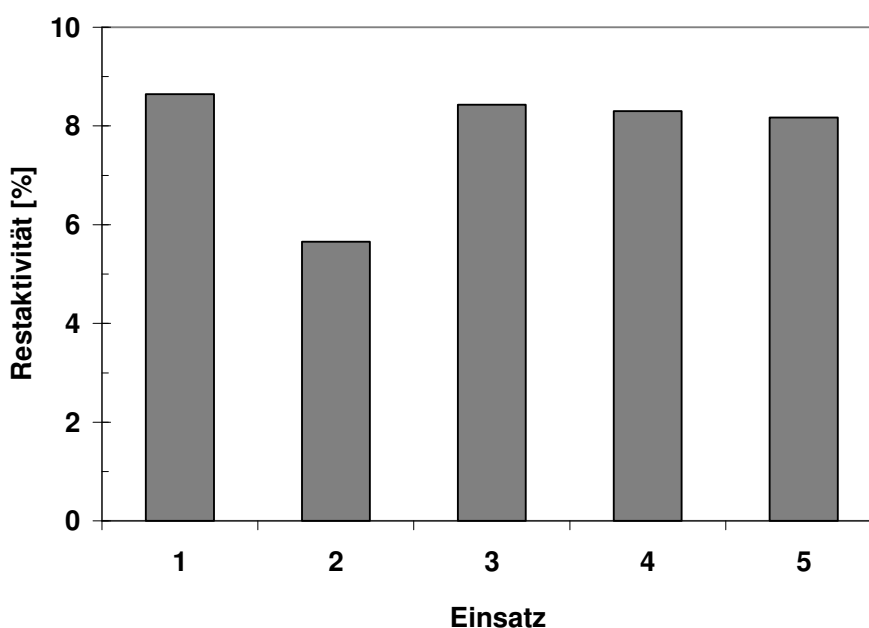


Abbildung 4-19: Restaktivität und Mehrfacheinsatz der in Hohlkugeln eingeschlossenen LeuDH

Auch die Hohlkugeln mit eingeschlossener LeuDH zeigen im Mehrfacheinsatz eine sehr gute Langzeitaktivität und verlieren während der 5 Einsätze kaum an Aktivität. Die geringe Restaktivität von 8,6 % könnte auch hierbei auf eine Diffusionslimitierung des zugesetzten NADH's zurückgeführt werden. Diese ist eventuell noch stärker als die Diffusionslimitierung bei der verkapselten FDH ausgeprägt, da die Konzentration an NADH in diesem Testansatz nur 1 mM beträgt (siehe Kapitel 3.1.1.2). Auch sind die Kugeln sehr stark gequollen und haben den Durchmesser auf 1,12 mm vergrößert. Dies kann ebenfalls die Diffusionslimitierung verstärken.

Aufgrund des guten Mehrfacheinsatzes jedoch eignen sich die Polyelektrolythohlkugeln auch für die Verkapselung der LeuDH und werden daher in weiteren Experimenten für die Parallelimmobilisierung beider Enzyme verwendet.

#### 4.4 Gemeinsame Immobilisierung der FDH und der LeuDH

Da die Verkapselung vor allem für die FDH die am besten geeignete Methode ist, wurden die beiden Enzyme in Polyelektrolytkapseln aus CS und PDADMAC verkapselt. Andere Methoden wie kovalente Bindungen oder Ausflockungen haben sich bei der Anwendung für die FDH als ungeeignet erwiesen, daher wurden diese Methoden weder für die Immobilisierung der LeuDH noch für die Parallelimmobilisierung angewendet.

##### 4.4.1 Verkapselung beider Enzyme in CS/PDADMAC Kugeln

Hierbei wurden beide Enzyme in eine Hohlkugel gemeinsam verkapselt. Dazu wurde das Cellulosesulfat, nachdem es wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben auf einen pH-Wert zwischen 7,5-8,5 eingestellt wurde, mit jeweils ungefähr 10 U/g<sub>CS</sub> LeuDH und FDH vermischt, in PDADMAC eingetropft und wie in Kapitel 3.2.1 und Tabelle 3-1 beschrieben verkapselt. Von den gebildeten Kapseln wurde die Gesamtaktivität der beiden Enzyme gemäß Kapitel 3.1.1.6 sowie die jeweiligen Aktivitäten der Einzelenzyme gemäß Kapitel 3.1.1.1, 3.1.1.2 und 3.1.1.5 gemessen und die Restaktivitäten entsprechend Formel 3-4 und 3-3 berechnet.

Die Restaktivität der Gesamtreaktion ist bezogen auf die geringste, also geschwindigkeitsbestimmende eingesetzte Enzymaktivität. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-20 dargestellt.

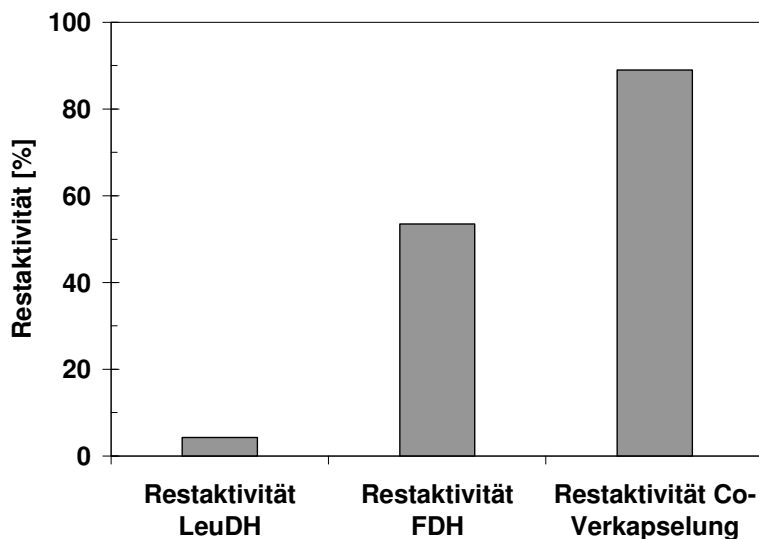


Abbildung 4-20: Restaktivitäten der einzeln verkapselten Enzyme und der Parallelverkapselung

Dort ist zu erkennen, dass sich die Restaktivität der Gesamtreaktion auf 90% erhöht hat. Dies ist, vom Enzym-Membran-Reaktor abgesehen, das beste Ergebnis, was in der Immobilisierung der FDH und der Parallelimmobilisierung von zwei Enzymen zur

Cofaktorregenerierung bisher erreicht wurde (Stand der Literaturrecherche). Dies kann daran liegen, dass vorherige, geringe Restaktivität der Einzelenzyme tatsächlich diffusionslimitiert durch den Cofaktor war. Dies wurde durch die Parallelimmobilisierung behoben, was in Abbildung 4-21 noch einmal verdeutlicht wird.

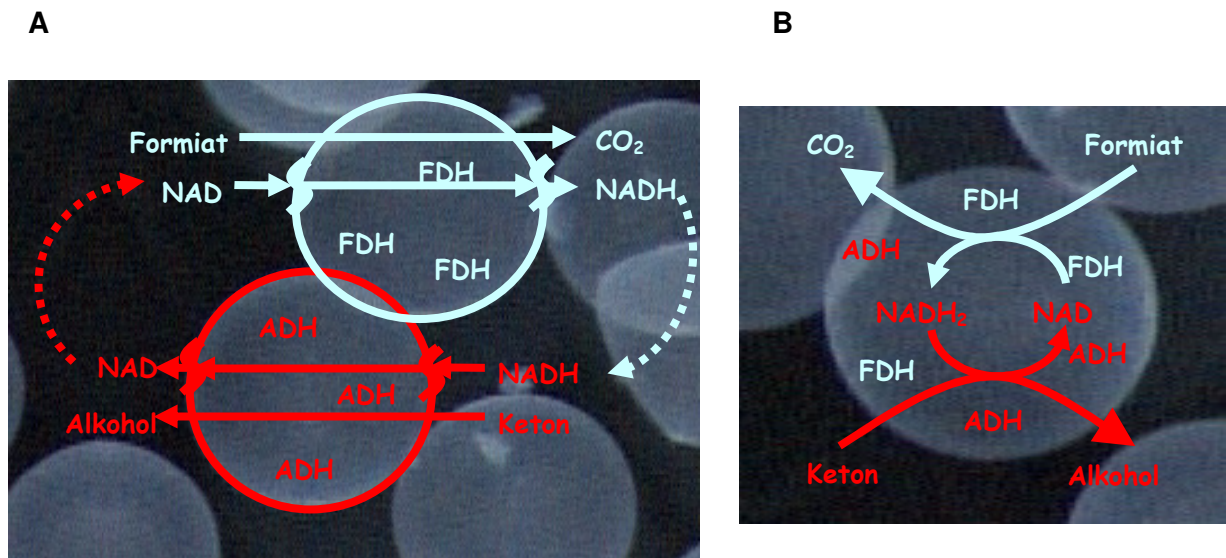


Abbildung 4-21: A) Reaktion mit einzeln verkapselten Enzymen (Diffusion des Cofaktors durch die Kapselmembran nötig)  
 B) Reaktion mit parallelimmobilisierten Enzymen (Cofaktor wird innerhalb der Kapsel regeneriert)

Die Restaktivität der FDH in der Einzelreaktion ist auf 53 % gestiegen. Es wurde gegenüber den vorherigen Versuchen eine geringere PDADMAC-Konzentration benutzt, um runde, nicht geschrumpfte Kugeln mit definierter Geometrie zu bekommen. Infolge der dadurch entstandenen relativ geringen Membrandicke (siehe Kapitel 4.2.3.6) könnten zusätzliche Poren (Risse, Löcher) entstanden sein, durch welche die FDH aus der Membran an die in das Reaktionsmedium hinaus diffundiert ist und für einen Teil der FDH keine Diffusionslimitierung bestand. Dies wurde überprüft, indem die Kugeln für die FDH-Messung mehrfach eingesetzt wurden. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Kugeln nach dem 1. Einsatz stark absank (Experimente hier nicht dargestellt). Diesem Effekt könnte folgendermaßen entgegengewirkt werden: Vergrößerung der Membrandicke durch höhere Konzentrationen an Cellulosesulfat und PDADMAC sowie durch längere Vernetzungszeiten.

Es ist festzuhalten, dass die Restaktivität der Gesamtreaktion mit 90 % auch die Restaktivität der FDH übersteigt. In weiteren Versuchen wurden die Hohlkugeln mit beiden Enzymen auf ihre mechanische Stabilität und ihren Mehrfachfacheinsatz hin weiter optimiert.

#### 4.4.2 Optimierung der Polyelektrolytkugeln

Eine weitere wichtige Optimierung ist die Verbesserung der Langzeitaktivität und der mechanischen Stabilität im Mehrfacheinsatz. Die FDH verliert im Mehrfacheinsatz der Polyelektrolytkugeln, vor allem direkt nach dem ersten Einsatz, an Aktivität, was auch in Kapitel 4.2.3.2 ersichtlich ist. Dabei wurde der größte Teil der FDH nicht inaktiviert, sondern diffundierte in das Außenmedium, wie in Kapitel 4.2.3.3 gezeigt werden konnte. Ein Grund dafür könnte der pH-Wert der Polyelektrolytlösungen sein, durch welchen die FDH elektrostatisch in Richtung der sich bildenden Membranhülle gezogen wird. Dies ist unten weiter erläutert. Eine weitere Möglichkeit, die Langzeitaktivität und die mechanische Stabilität zu verbessern ist die Erhöhung der Konzentration beider Polyelektrolyte. Dadurch könnte eine dickere und damit festere Membran hergestellt werden. Dies ist im Folgenden ebenfalls erläutert.

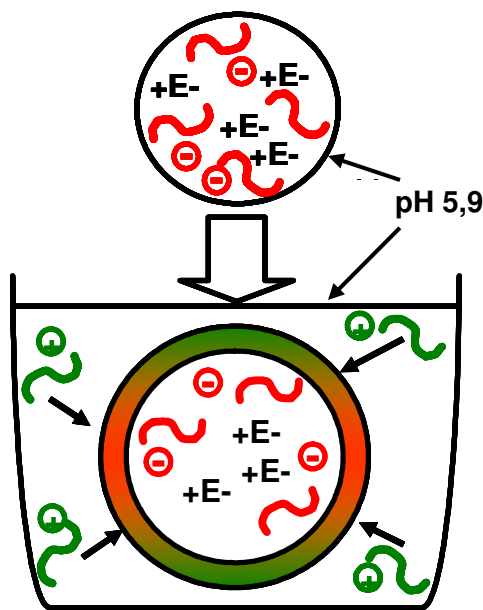
1. **Änderung der Konzentrationen der Polyelektrolyten:** Um festere Membranen der Hohlkugeln zu bekommen, wurden die Konzentrationen des Cellulosesulfates und des PDADMACs jeweils auf 3 % eingestellt. Einerseits haben damit die Polyelektrolyten beide dieselbe Konzentration. Dadurch können die Vernetzungszeiten verlängert werden, ohne dass die Kugeln während des Vernetzungsvorganges schrumpfen. Dies und auch die Erhöhung der Konzentrationen auf 3 % bewirkt eine dickere Membran, die die FDH besser in den Hohlkugeln zurückhalten kann und außerdem die Stabilität der Hohlkugeln erhöht.
2. **pH-Wert-Änderung der Polyelektrolytlösungen während des Herstellungsprozesses:** Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, liegt der Isoelektrische Punkt der FDH bei pH 5,4. D.h., dass die FDH bei einem pH-Wert von 8, den die Polyelektrolytlösungen während des Herstellungsprozesses besitzen, negativ geladen ist. Wird nun das Cellulosesulfat/FDH-Gemisch in den positiv-geladenen Polyelektrolyten PDADMAC eingetropft, kann auch die FDH elektrostatisch nach außen in Richtung der sich bildenden Membranhülle gezogen werden. Dadurch kann es passieren, dass die FDH entweder in die Membran mit eingeschlossen wird, oder auf der Außenseite liegt und dort elektrostatisch angezogen wird. Dies ist in Abbildung 4-22 verdeutlicht. Dies kann zur Folge haben, dass sich die FDH entweder, vor allem bei einer geringen Membrandicke der Polyelektrolytkugeln, aus der Membran herauslöst und zusätzliche Poren (Risse, Löcher) entstehen oder die FDH von der Oberfläche, vor allem beim 1. Einsatz, abgewaschen wird. Wenn nun der pH-Wert der Herstellungslösungen, vor allem des Cellulosesulfates, auf einen pH-Wert in der Nähe des Isoelektrischen Punktes der FDH erniedrigt wird, ist die



FDH ladungsneutral und verbleibt während des Herstellungsprozesses innerhalb des Tropfens. Dies kann bewirken, dass die FDH während des Einsatzes besser innerhalb des Immobilisates zurückgehalten wird und damit die Hohlkugeln häufiger und länger einsetzbar sind, ohne dass sie an Aktivität verlieren.

**pH-Wert beider Herstellungslösungen: 5,9**

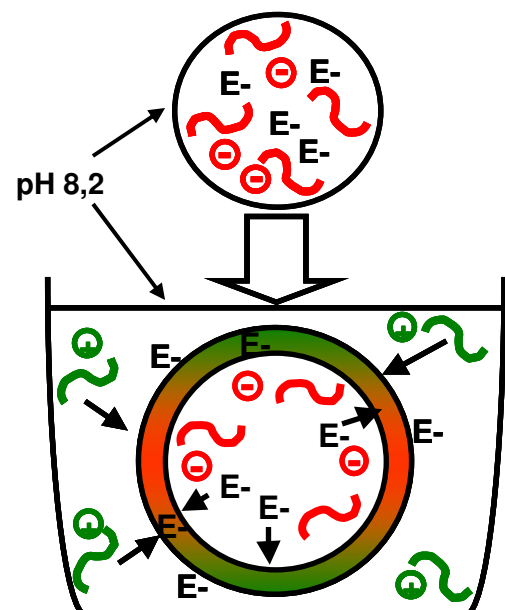
⇒ FDH ist neutral +E-



FDH bleibt in der Kapsel

**pH-Wert beider Herstellungslösungen: 8,2**

⇒ FDH ist negativ geladen E-



FDH wird durch ionische Wechselwirkungen nach außen gezogen

PDADMAC

Cellulosesulfat

Abbildung 4-22: Möglicher Einfluss des pH-Wertes während der Herstellung auf die Enzymverteilung

In Vorversuchen wurde der Einfluß des pH-Wertes in CS und PDADMAC auf die FDH geprüft und es konnte bei pH 5,9 kein signifikant negativer Einfluss auf die Aktivität der FDH festgestellt werden (siehe auch Kapitel 4.2.3.1 und 4.3.1).

Daher wurden Hohlkugeln unter folgenden, in Tabelle 4-2 dargestellten Bedingungen entsprechend Kapitel 3.2.1 und Tabelle 3-1 hergestellt.

Tabelle 4-2: Herstellungsbedingungen der Hohlkugeln bei unterschiedlichen pH-Werten

|  | pH-Wert 5,9 | pH-Wert 8,2 |
|--|-------------|-------------|
| <b>Beladung der FDH [U/g<sub>cs</sub>]</b>     | 7,7         | 8,2         |
| <b>Beladung der LeuDH [U/g<sub>cs</sub>]</b>   | 9,4         | 9,4         |
| <b>c (Cellulosesulfat) [%]</b>                 | 3           | 3           |
| <b>c (PDADMAC) [%]</b>                         | 3           | 3           |
| <b>pH (Cellulosesulfat)</b>                    | 5,9         | 8,2         |
| <b>pH (PDADMAC)</b>                            | 6           | 8,2         |
| <b>Eintropfzeit [min]</b>                      | 1           | 1           |
| <b>Vernetzungszeit [min]</b>                   | 17          | 17          |
| <b>oberer und seitlicher Abblasdruck [bar]</b> | 0,35/0,15   | 0,35/0,15   |

Die beiden Polyelektrolytlösungen wurden während des Herstellungsprozesses der Hohlkugeln in 2 Versuchen auf 2 unterschiedliche pH-Werte eingestellt, wie in Abbildung 4-22 dargestellt. Damit kann der Enzymverlust der beiden verschiedenen Kugelsorten miteinander verglichen werden. Der geringere pH-Wert wurde zu pH 5,9 gewählt. Es war notwendig, diesen pH-Wert so zu wählen, daß er größer als der Isoelektrische Punkt war. Im Bereich des Isoelektrischen Punktes, um pH 5,4, besteht die Inaktivierung des Enzyms. Der höhere pH-Wert wurde zu 8,2 gewählt, was im pH-Bereich der vorherigen Verkapselungsversuche lag. Die Langzeitaktivität der FDH und der LeuDH wurde zusätzlich in Cellulosesulfat bei einem pH-Wert von 5,9 überprüft, um sicherzustellen, daß die Enzyme nicht während des Herstellungsprozesses inaktiviert werden.

Die Konzentration des Cellulosesulfates und des PDADMACs wurde in beiden Fällen von jeweils 2,16 bzw. 4/2,4 % auf 3 % geändert, wodurch auch die Vernetzungszeit auf 17 min verlängert werden konnte. Da das Cellulosesulfat durch die erhöhte Konzentration viskoser geworden ist, mußte auch der obere Abblasdruck auf 0,35 bar erhöht werden, um runde Hohlkugeln zu bekommen. Dies wurde in geeigneten Vorversuchen getestet (Experimente nicht dargestellt).

Um den Enzymverlust der Kapseln zu bestimmen, wurden definierte Aliquots der Kugeln in einer Lösung aus 0,05 M Kaliumphosphat und 0,4 M Natriumformiat, pH 8,0, bei 30 °C für 1700 min gerührt. Da in Kapitel 4.1.1.2 nachgewiesen wurde, daß die FDH bei 30 °C stabil bleibt, konnte davon ausgegangen werden, daß die FDH während des Rührprozesses in der Lösung nicht an Aktivität verliert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben

entnommen und die Enzymaktivität der FDH gemäß Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.1.3 bestimmt. Damit konnte der Verlust an FDH in die Lösung in [%] entsprechend Formel 4-3 berechnet werden. Auch wurde der Enzymverlust der FDH in das PDADMAC während des Herstellungsprozesses bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-23 dargestellt.

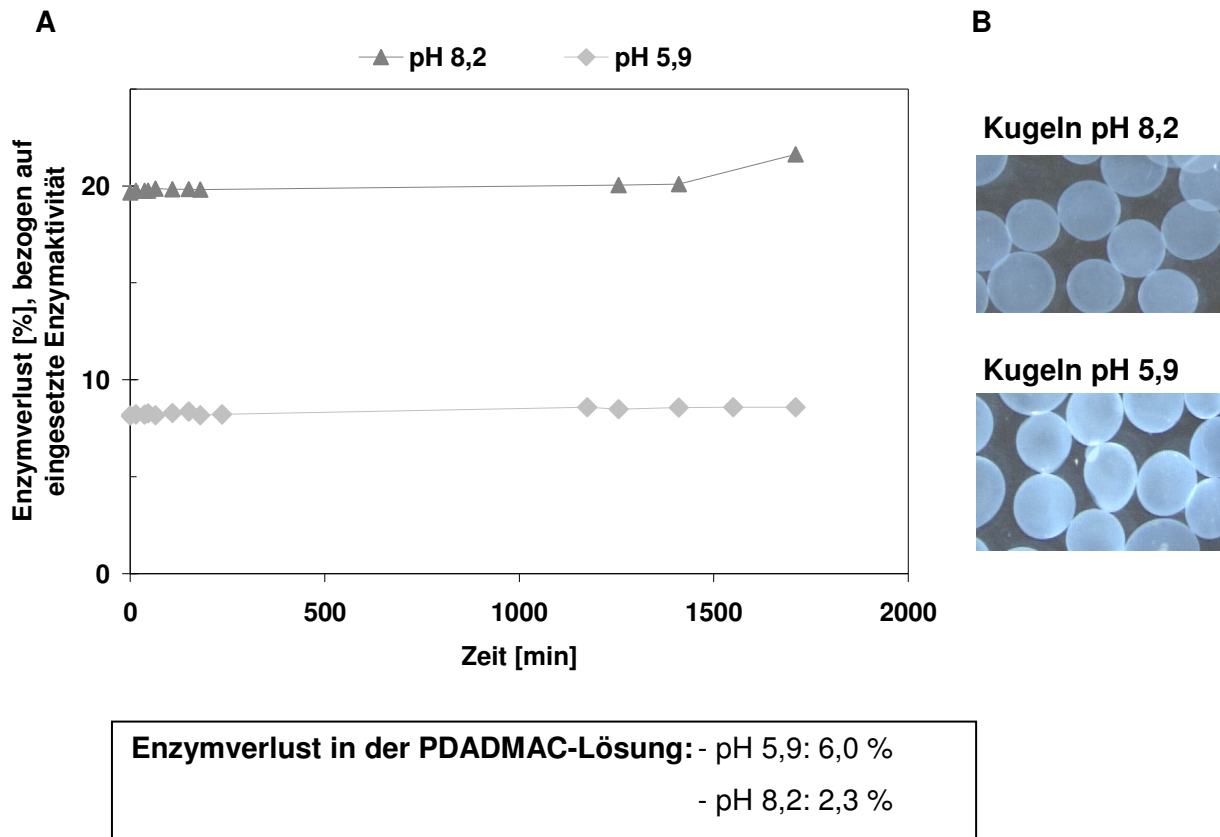


Abbildung 4-23: A) Enzymverlust in das umgebene Medium bei Kugeln hergestellt bei pH-Wert 5,9 und pH-Wert 8,2  
 B) Kugelform der Kugeln hergestellt bei pH-Wert 5,9 und pH-Wert 8,2

Wie in Abbildung 4-23 zu sehen ist, liegt der größte Verlust an FDH tatsächlich bei den Hohlkugeln vor, die bei einem pH-Wert von 8,2 hergestellt wurden. Dieser beträgt nach 1700 min 21 %. Dies entspricht dem Ergebnis in Kapitel 4.2.3.3. Dort konnte festgestellt werden, daß Verlust der FDH ins Medium nach 91 h (5460 min) ebenfalls 22 % betrug. Auch der pH-Wert der Herstellungslösungen CS und PDADMAC ist in diesem Versuch auf ~8 eingestellt worden. Der größte Teil des FDH-Verlustes (18,4 %) entstand sofort, nachdem die Hohlkugeln in die Lösung aus Kaliumphosphat und Natriumformiat gelangten. Wahrscheinlich war ein Teil der FDH größtenteils an der Oberfläche der Kapseln lokalisiert und wurde dort zunächst durch ionische Wechselwirkungen fixiert. Als die Kapseln in die Salzlösung gelangten, wurde die FDH sofort abgewaschen. Im Gegenteil dazu war der Enzymverlust bei den Kapseln, die bei einem pH-Wert von 5,9 hergestellt worden sind, mit

8,5 % wesentlich geringer. Anscheinend wurde hier tatsächlich, wie es in Abbildung 4-22 theoretisch gezeigt wurde, weniger FDH auf die Oberfläche der Kugelmembran gezogen.

Der Verlust an FDH in das PDADMAC ist teilweise auf Meßungenauigkeiten zurückzuführen, da die Bestimmung der Enzymaktivität im PDADMAC schwierig war. Durch das relativ große Volumen des PDADMACs war die entsprechende Enzymkonzentration relativ gering, was die Enzymmessung an die Grenze des quantitativen Nachweises brachte. Weiterhin ist es möglich, daß während des Eintropfprozesses einige Tropfen auf der Oberfläche des PDADMACs zerplatzten oder an den Rand des Eintropfgefäßes gelangten und die FDH sich so direkt im PDADMAC gelöst hat.

Während des 1700 min langen Rührvorganges ist der Verlust der FDH in das Medium nur geringfügig gestiegen. Wahrscheinlich hat die Erhöhung der Cellulosesulfatkonzentration und die Erhöhung der Vernetzungszeit dazu geführt, daß die Kapselmembran dicker geworden ist und die Kapseln damit mechanisch stabiler geworden sind.

Die Kugelform ist bei beiden Herstellungsmethoden, wie in Abbildung 4-23 zu sehen ist, trotz der verlängerten Vernetzungszeit rund, gleichmäßig und damit zufriedenstellend. Dies ist ebenfalls auf die Konzentrationen der Polyelektrolyte PDADMAC und Cellulosesulfat zurückzuführen, da diese nun gleich groß sind und damit eine geringere Schrumpfung aufgrund von osmotischen Effekten vorhanden sind.

Da die Ergebnisse der Herstellung bei pH-Wert 5,9 die bisher besten Immobilisierungserfolge der Paralellimmobilisierung von FDH und LeuDH sind, wurde einerseits der Mehrfacheinsatz überprüft und weiterhin das Ergebnis in einem Reproduktionsversuch verifiziert.

#### A) Mehrfacheinsatz

Hierzu wurde ein Aliquot der bei pH-Wert 5,9 hergestellten Kapseln aus dem obigen Abschnitt mehrfach eingesetzt und in jedem Einsatz die Aktivität als Umsatz von TMP zu *L-tert*-Leucin gemäß Kapitel 3.1.1.6 gemessen. Mit der gemessenen Aktivität wurde die Restaktivität in Bezug auf die eingesetzten Enzyme bzw. in Bezug auf die eingesetzte FDH entsprechend Formel 3-3 berechnet. Der Mehrfacheinsatz erfolgte wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben, wobei die Waschlösung in diesem Fall 50 mM Kaliumphosphatpuffer war. Die Kugeln wurden 7mal wiedereingesetzt, um zu untersuchen, ob ein Langzeiteinsatz der Immobilisate möglich ist. Ein Einsatz dauerte 3 h.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4-24 zusehen.

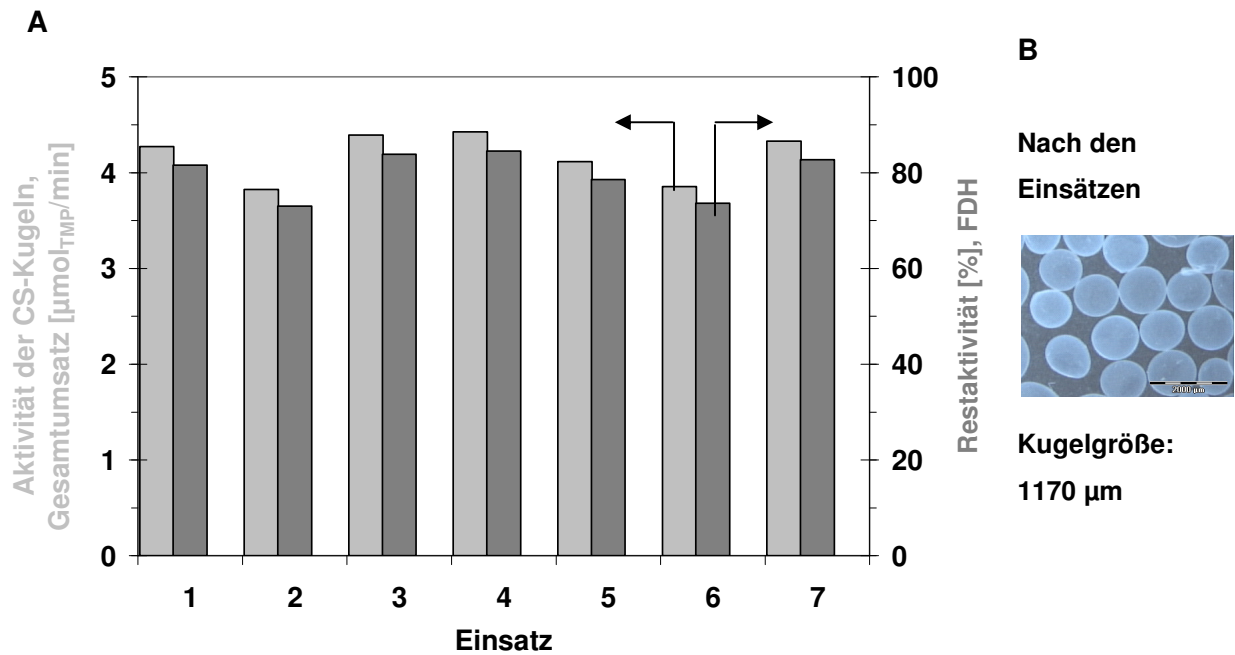


Abbildung 4-24: A) Restaktivität der Kugeln während des 7fachen Einsatzes  
B) Hohlkugeln nach den Einsätzen, Größe der Kugeln

Wie in Abbildung 4-24 zu sehen ist, beträgt die Restaktivität der Kugeln ungefähr 80 % und verliert auch nach 7 Einsätzen nicht an Aktivität. Den Kugeln selber ist ebenfalls nach 7 Einsätzen kein Verschleiß gegenüber dem Anfangszustand anzusehen, damit zeigen sie eine gute mechanische Stabilität. Damit wurde eine sehr gut geeignete Immobilisierungsmethode zur Parallelimmobilisierung der FDH und der LeuDH für eine Cofaktorregenerierung gefunden, die alle an Immobilisate gestellten Anforderungen erfüllt:

- geringer Verlust an Enzymaktivität während der Herstellung
- kein Aktivitätsverlust nach mehrfachem Einsatz der Immobilisate
- keine Verschleißerscheinungen des Immobilisates selber
- einfache und kostengünstige Herstellung des Immobilisates
- leichte Handhabung und einfache Abtrennung des Immobilisates

#### B) Reproduktionsversuch

Um den obigen Versuch zu verifizieren, wurde er noch einmal unter denselben Bedingungen wie in A beschrieben wiederholt. Die einzige Änderung war die Charge des Cellulosesulfates. Das Ergebnis dieses Reproduktionsversuches ist in Abbildung 4-25 dargestellt. Wie dort zu sehen ist, konnte das Ergebnis des obigen Versuches reproduziert werden.

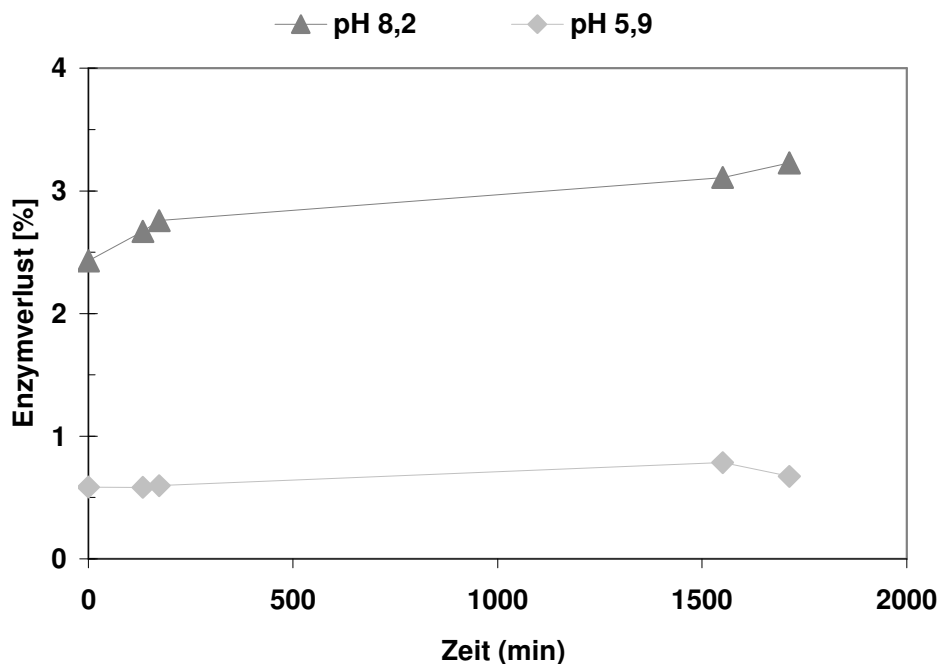


Abbildung 4-25: Enzymverlust in das umgebene Medium bei Kugeln hergestellt bei pH-Wert 5,9 und pH-Wert 8,2, Reproduktionsversuch

Der Verlust an FDH in die Lösung war bei den Hohlkugeln, die bei pH 8,2 hergestellt wurden, um ca. das vierfache höher als bei den Kugeln, die bei einem pH-Wert von 5,9 hergestellt wurden. In diesem Versuch ist der Enzymverlust während des Rührens sogar leicht gestiegen (pH 8,2), was darauf schließen lässt, dass sich die FDH möglicherweise vermehrt in der Membran befand und durch das langsame Herauslösen dieser langsam Löcher und Risse in der Membran entstanden, durch welche die FDH hinaus diffundiert ist. Es lässt sich weiterhin feststellen, dass der Enzymverlust bei beiden Herstellungsmethoden wesentlich geringer war als bei dem vorherigen Versuch. Da alles außer der Charge des Cellulosesulfates gleich geblieben ist, ist zu vermuten, dass dies an der neuen Charge des Cellulosesulfates liegt. Möglicherweise fand in der vorherigen Charge durch Überlagerung eine Veränderung des Polymers statt.

## 5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION:

### IMMOBILISIERUNG VON GANZEN ZELLEN

Wie in Kapitel 3.3.5. und Kapitel 3.6. ausführlich beschrieben wurde, stellt die Verwendung von Ganzzellkatalysatoren, welche die LeuDH und die FDH exprimieren können, anstelle von isolierten Enzymen eine interessante Alternative dar. Es können z.B. die Kosten für die Enzymbereinigung gespart werden. Es wurden gentechnisch veränderte *E. coli*-Zellen (JM109, zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Menzel, Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart) benutzt, welche auf zwei Plasmiden (pAM10.1 und pAM3.25) die

Gensequenzen jeweils für die Formiatdehydrogenase und die Leucindehydrogenase besitzen und somit als Ganzzellkatalysator fungieren können. Eine genaue Beschreibung der Zellen und der verwendeten Plasmide ist in Kapitel 3.3.1 gegeben. Für jede Immobilisierung wurden die Zellen frisch entsprechend Kapitel 3.3.4-3.3.6 frisch angezogen und permeabilisiert.

### **5.1 Einschluss der Zellen in PVAL-Linsen**

Zunächst wurde versucht, die Zellen in PVAL-Linsen einzuschließen, da die Immobilisate neben dem sehr kostengünstiges und einfachen Herstellungsverfahren viele günstige Eigenschaften wie mechanische Stabilität, gute Biokompatibilität, günstige Linsenform, welches die Diffusionslimitierung verringert, leichte Abtrennbarkeit, chemische Stabilität gegenüber Substraten etc. [59;130;139] aufweist.

Ein Problem könnte jedoch die erforderliche Biomassebeladung sein. Da mit ruhenden, sich nicht mehr vermehrenden Zellen gearbeitet wird, ist eine Mindestanfangsbeladung an Biofeuchtmasse von 15 % erforderlich, damit die Zellimmobilisate effizient sind. Bei niedrigeren Biomassekonzentrationen ist die Produktivität der Immobilisate zu gering. Mit dieser hohen Konzentration an Biomasse wurden bis jetzt noch keine Linsen hergestellt.

Die Herstellung dieser Linsen erfolgte entsprechend Abschnitt 3.2.6. Es wurde in diesem Versuch im Gegensatz zu allen weiteren Versuchen der Stamm *E.coli* BW3113 (pAM10.1/pAM3.25) verwendet, da diese Zellen direkt aus einer Hochzelldichtefermentationen von Frau Dr. Menzel zur Verfügung gestellt wurden. Die verlorene Biomasse in der Wasch- und der Stabilizerlösung sowie den jeweiligen Substratlösungen wurde mittels OD-Messung gemessen und die restliche, in den Linsen verbliebene Biofeuchtmasse in % im Vergleich zu der eingesetzten Biomasse in Abbildung 5-1 dargestellt.

Wie dort zu sehen ist, nimmt die Biomassekonzentration in den Linsen stetig ab, bis nach 3 Einsätzen jeweils nur noch 54 % bzw. 25 % vorhanden sind. Wurden die Linsen 70 min getrocknet, war der Biomasseverlust vor allem während der letzten beiden Einsätze geringer als bei den Linsen, die 50 min lang getrocknet wurden.

Möglicherweise wird die Struktur des Polymernetzwerkes von dem PVAL durch die hohe Biomassebeladung so gestört, dass eine offenporige Struktur entsteht, durch die die Zellen ausgewaschen werden. Dies wird durch die linsenförmige Form, welche eine große Oberfläche im Vergleich zum Volumen aufweist, noch verstärkt.

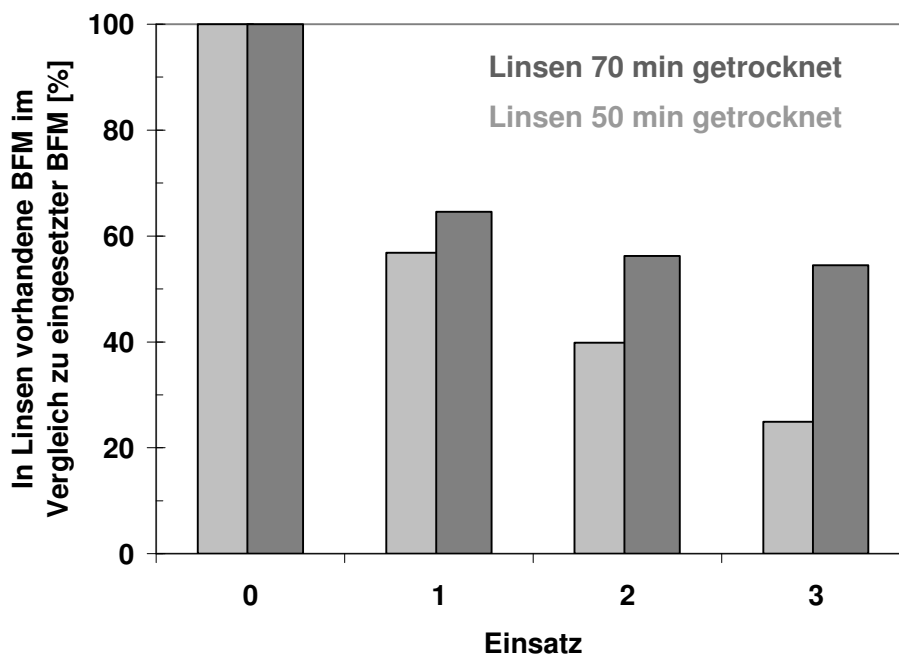


Abbildung 5-1: Biomasseverlust bei in PVAL-Linsen eingeschlossenen Zellen

Daher sind die PVAL-Linsen nicht als Immobilisierungsmethode für diese Zellen geeignet.

## 5.2 Einschluss der Zellen in Calcium-Alginat-Kugeln

Hierbei erfolgte die Immobilisierung durch den Einschluss der Zellen in Calcium-Alginat-Gelkugeln. Das Prinzip dieser Immobilisierungsmethode ist in Kapitel 2.6.1.4 erläutert. Es wurde das Natriumalginat Protanal LF 20/60 der Firma FMC Biopolymer AS, Haugesund (Norwegen) benutzt. Der Einschluss erfolgte gemäß Kapitel 3.2.5.1.

### 5.2.1 Vergleich der Aktivität von freien Zellen mit immobilisierten Zellen

Um die Eignung dieser Immobilisierungsmethode für die ganzen Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen gemäß Kapitel 3.2.5.1 in Calcium-Alginat Kugeln eingeschlossen und zunächst die Aktivität dieser Kugeln mit der Aktivität der freien Zellen (Messung s. Kapitel 3.3.7.1) verglichen. Vorher wurden einige Vorversuche durchgeführt, um die richtigen Einstellungen der Verkapselungsanlage zu finden, unter welchen optimale, also runde und kleine, Alginatkugeln entstehen. Der Versuch wurde zweifach gemacht („Charge 1“ und „Charge 2“), um das Ergebnis verifizieren zu können und ist in Abbildung 5-2 dargestellt. Die genauen Verkapselungsbedingungen sind Tabelle 3-3 zu entnehmen.

Da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass die Vernetzungsdauer zwischen 30 min und 90 min liegen kann, ohne dass zu einer Veränderung des Immobilisates kommt, lag die Vernetzungszeit in den weiteren Versuchen innerhalb dieser Zeitspanne. Zu der Messung der Zellaktivität wurde neben den für den Umsatz wichtigen Substanzen 50 mM



Calciumchlorid hinzugegeben, um die Alginatkugeln gegenüber den vorhandenen Salzen zu stabilisieren.

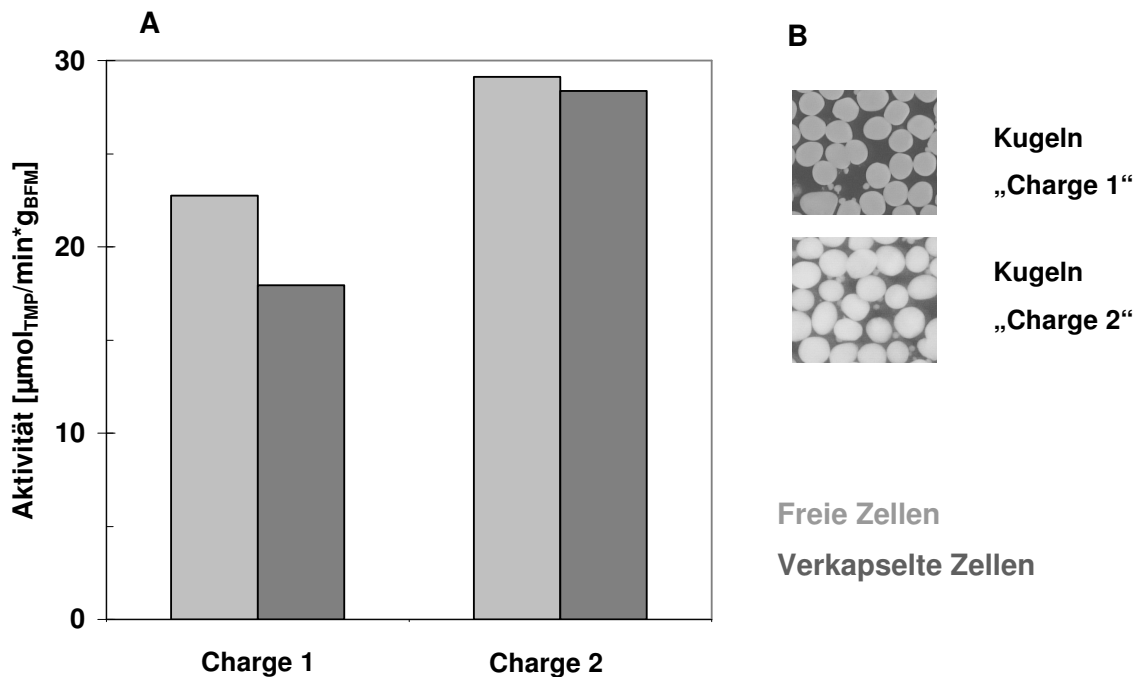


Abbildung 5-2: A) Aktivitätsvergleich freie und in Calciumalginat eingeschlossene Zellen  
B) Kugelform der Calciumalginatkugeln (jeweils 2 Chargen)

Wie in der Abbildung zu sehen ist, liegt die Aktivität der verkapselten Zellen in beiden Fällen ungefähr bei der Aktivität der freien Zellen. Leichte Abweichungen können an Meßungenauigkeiten und Ungenauigkeiten in der Berechnung der Beladung der Kugeln mit Biofeuchtmasse liegen. Es scheint unter den gegebenen Bedingungen keine Inaktivierung der Zellen durch den Immobilisierungsvorgang und keine Diffusionslimitierung zu geben.

Auch die in Abbildung 5-2 dargestellte Kugelform ist rund, gleichmäßig und damit zufrieden stellend.

### 5.2.2 Mehrfacheinsatz der Alginatkugeln

Um die Langzeitaktivität und mechanische Stabilität der Kugeln im Mehrfacheinsatz zu testen, wurden Alginatkugeln hergestellt, die 10 Mal wiedereingesetzt wurden. Der einzelne Einsatz geschah entsprechend Kapitel 3.3.7 und 3.3.7.2 und betrug 2-3 Stunden. Der Medienwechsel zwischen den einzelnen Einsätzen geschah wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben. Die Zeit von der Herstellung der Kugeln bis zum letzten Einsatz betrug 10 Tage. Während der Nacht wurden die Kugeln bei 4 °C in Aufbewahrungspuffer (siehe Kapitel 3.3.2) aufbewahrt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 5-3 gezeigt. Wie dort zu sehen ist, haben die Zellen in den Alginatekugeln auch nach 10 Einsätzen keine Aktivität verloren. Das bedeutet, dass einerseits die Zellen während der Einsätze nicht aus den Alginatekugeln heraus diffundiert sind. Außerdem bedeutet es, dass die Enzyme LeuDH und FDH, die in der Zelle exprimiert wurden und für den Stoffumsatz verantwortlich sind, weder während der langen Einsatzzeit inaktiviert worden sind noch durch die Zellmembran des Ganzzellkatalysators in das Medium diffundiert sind. Sie wurden trotz der Permeabilisierung der Zellmembran mit Toluol in der Zelle gehalten.

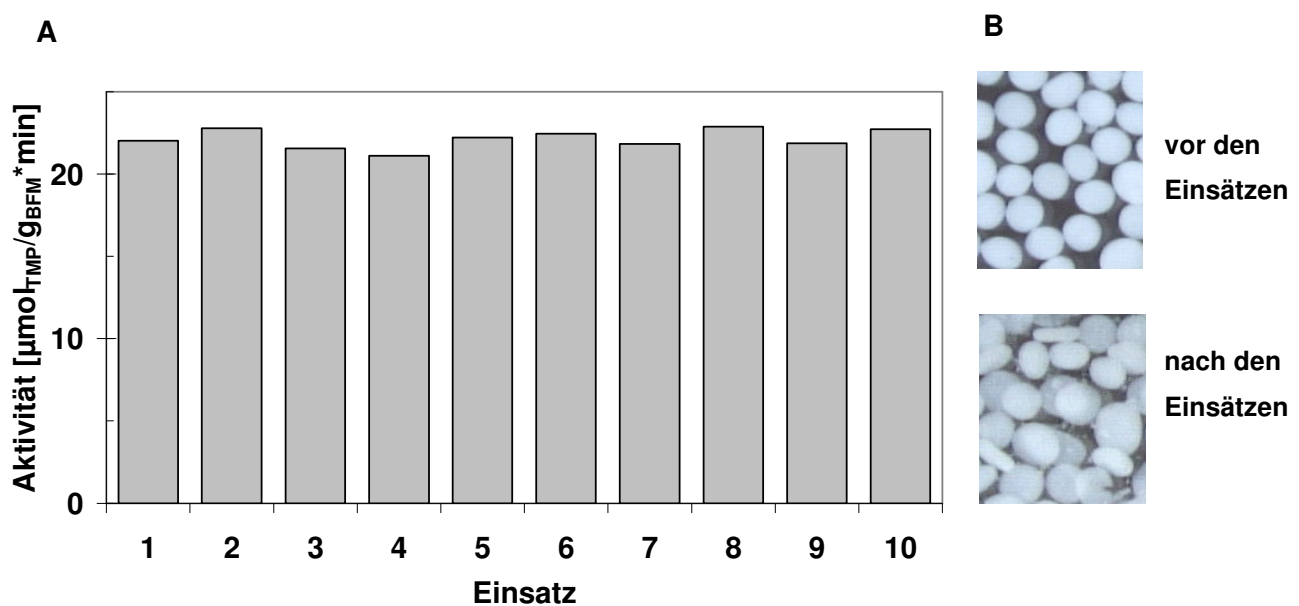


Abbildung 5-3: A) Mehrfacheinsatz der Calciumalginateimmobilisate  
B) Kugelform vor und nach den Einsätzen

Allerdings ist in Abbildung 5-3 ebenfalls zu sehen, dass die Kugeln nach den Einsätzen etwas deformiert wurden. Dies kann möglicherweise an der Benutzung eines Scheibenrührers liegen, welcher am Gefäßboden starke Scherkräfte hervorruft. Ein negativer Einfluß auf die Enzymaktivität bestand allerdings nicht. Weiterhin war ein starker, weißlicher Niederschlag nach den jeweiligen Einsätzen zu erkennen. Dies kann an der Zugabe von Calciumchlorid liegen. Während der Regeneration des  $\text{NAD}^+$  zu NADH durch die FDH bildet sich aus Formiat Kohlendioxid und Wasser. Das Kohlendioxid kann mit Calcium das schwer lösliche Salz Calciumcarbonat bilden, das als weißlicher Niederschlag ausfällt.

Um die Immobilisate bezüglich der Substratkonzentrationen weiter zu optimieren, wurde in weiteren Versuchen die Abhängigkeit der Zellaktivität von den Substratkonzentrationen gemessen.

### 5.2.3 Einfluß der Substratkonzentration auf die Zellaktivität

Da es aus wirtschaftlicher Sicht wichtig ist, mit einer geringen Cofaktorkonzentration und möglichst hohen Substratkonzentrationen zu arbeiten, wurde im Folgenden die Abhängigkeit der Zellaktivität von diesen Konzentrationen gemessen. Da sowohl Ammonium als auch Formiat getrennt voneinander einen Einfluß auf die Aktivität haben können, wurden anstelle von Ammoniumformiat die Substrate Natriumformiat und Ammoniumchlorid verwendet. Für die Messungen wurden die in Tabelle 5-1 dargestellten Bedingungen benutzt.

Tabelle 5-1: Messbedingungen der Experimente zum Einfluss der Substratkonzentration

| Varierte Substratkonzentration | NAD (A)      | Trimethylpyruvat (B) | Ammonium (C)      | Formiat (D)       |
|--------------------------------|--------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| MgCl <sub>2</sub> [mM]         | 1            | 1                    | 1                 | 1                 |
| CaCl <sub>2</sub> [mM]         | 50           | 50                   | 50                | 50                |
| MOPSO-Puffer [mM]              | 100          | 100                  | 100               | 100               |
| <b>Trimethylpyruvat [mM]</b>   | <b>100</b>   | <b>25 - 450</b>      | <b>100</b>        | <b>100</b>        |
| <b>NAD [mM]</b>                | <b>0 - 8</b> | <b>4</b>             | <b>4</b>          | <b>4</b>          |
| <b>Ammoniumformiat [mM]</b>    | <b>300</b>   | <b>300</b>           | -                 | -                 |
| <b>Ammoniumchlorid [mM]</b>    | -            | -                    | <b>100 - 1000</b> | <b>300</b>        |
| <b>Natriumformiat [mM]</b>     | -            | -                    | <b>300</b>        | <b>100 - 1400</b> |
| pH-Wert                        | 7 +- 0,2     | 7 +- 0,2             | 7 +- 0,2          | 7 +- 0,2          |
| Temperatur [°C]                | 30           | 30                   | 30                | 30                |

Die Ganzzellkatalysatoren wurden gemäß Kapitel 3.3.2 – 3.3.6 hergestellt und entsprechend Kapitel 3.2.5.1 und Tabelle 3-3 immobilisiert. Die Zellaktivität wurde wie in Kapitel 3.3.7 und 3.3.7.2 beschrieben gemessen, nur wurden anstelle der in Kapitel 3.3.7.2 beschriebenen Reaktionslösungen die in Tabelle 5-1 dargestellten Reaktionslösungen benutzt. Da in Kapitel 5.2.2 kein Aktivitätsverlust bei einem Mehrfacheinsatz der Kugeln festgestellt werden konnte, wurden die Immobilisate für die Messungen mehrfach benutzt. Das Medium wurde gemäß Kapitel 3.3.8 zwischen den einzelnen Einsätzen gewechselt. Während der Nacht wurden die Kugeln bei 4 °C in Aufbewahrungspuffer (siehe Kapitel 3.3.2) aufbewahrt.

Da beim Industriepartner das Verhältnis von Ammoniumformiat zu TMP auf 3:1 optimiert wurde, wurden die Konzentrationen von Ammonium und Formiat in einem höheren Bereich getestet als die TMP-Konzentrationen.

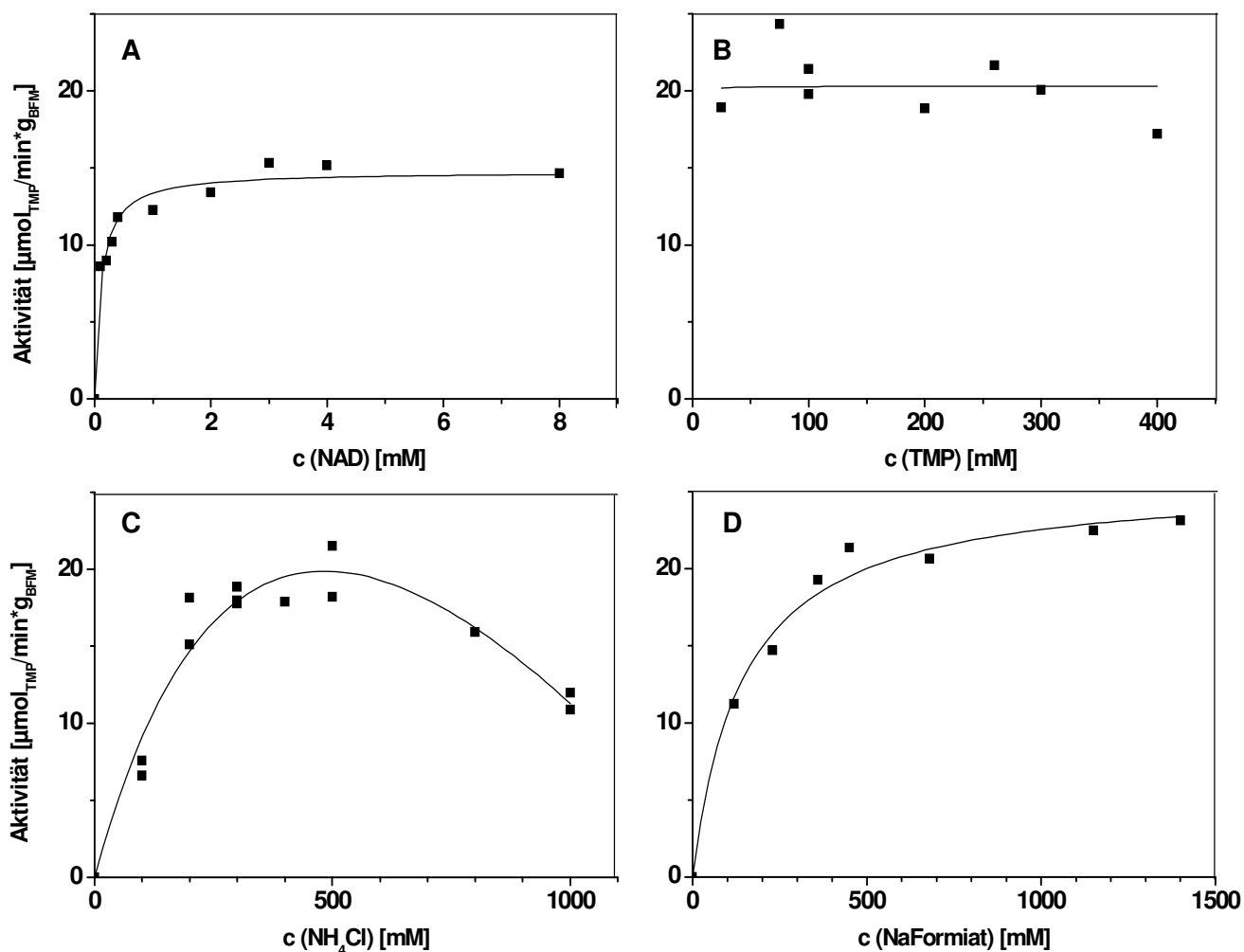


Abbildung 5-4: Abhängigkeit der Zellaktivität von der Substratkonzentration

- A) Variation der NAD-Konzentration
- B) Variation der TMP-Konzentration
- C) Variation der Ammoniumchlorid-Konzentration
- D) Variation der Natriumformiat-Konzentration

Das Ergebnis ist in Abbildung 5-4 dargestellt. Wie dort zu sehen ist, hat eine Erhöhung der Trimethylpyruvatkonzentration bis zu dem Wert von 450 mM keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Zellen. Im Gegensatz dazu steigt die Aktivität der Zellen in den anderen 3 Versuchsreihen mit zunehmender Konzentration bis zu einer maximalen Aktivität bei einer bestimmten Konzentration an (s. Abbildung 5-4 A, C, D). Diese Konzentrationen sind 450 mM Natriumformiat, 500 mM Ammoniumchlorid und 3 mM NAD. Bei dem Einfluss von Ammoniumchlorid ist weiterhin noch zu beobachten, dass sich ab einer Konzentration von 500 mM die Aktivität der Zellen bis auf weniger als 2/3 der maximalen Aktivität verringert (siehe Abbildung 5-4 C). Dies könnte auf eine Substrathemmung des Ammoniumchlorids zurückzuführen sein. Bei allen anderen Substraten ist keine Substrathemmung im untersuchten Konzentrationsbereich festzustellen. Allerdings wird bei TMP in der Literatur

von einer Substrathemmung bei 900 mM bei freien Zellen berichtet [103]. Dieser Bereich wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und sollte bei weiterführenden Entwicklungen untersucht werden.

Ein Vergleich mit einem cofaktorregenerierenden System, welches mit den isolierten, freien Enzymen FDH und LeuDH arbeitet, kann mit den kinetischen Daten aus [73] angestellt werden. Dort wurde die Produktion von L-*tert*-Leucin mit Hilfe der FDH und der LeuDH in einem Enzym-Membran-Reaktor (T=25 °C, pH=8) betrieben. Die Daten sind in Tabelle 5-2 dargestellt.

Tabelle 5-2: Kinetische Daten der FDH und der LeuDH aus [73]

| FDH   | LeuDH  |
|---|--|
| V <sub>max</sub> : 3,42 U/mg                                    | V <sub>max</sub> : 19,1 U/mg                   |
| K <sub>m</sub> (NAD): 0,04 mM                                   | K <sub>m</sub> (NADH): 0,022 mM                |
| K <sub>m</sub> (Formiat): 8,7 mM                                | K <sub>m</sub> (TMP): 22 mM                    |
| K <sub>is</sub> (TMP): 740 mM<br>(nicht-kompetitiver Inhibitor) | K <sub>i</sub> (TMP): 1838 mM                  |
| K <sub>i</sub> (NADH): 0,03 mM                                  | K <sub>i</sub> (L- <i>tert</i> -Leucin): 25 mM |

Dabei ist vor allem der K<sub>m</sub>-Wert interessant, der die Konzentration eines Substrates wiedergibt, bei welcher 50 % der Maximalaktivität erreicht ist. Er gibt damit bei freien, isolierten Enzymen die Enzym-Substrat-Affinität wieder. Dieser Wert ist bei dem Cofaktor für die LeuDH und die FDH jeweils bei 0,04 bzw. 0,022 mM und ist damit um nur ungefähr die Hälfte geringer als bei den hier gemessenen Ganzzellimmobilisaten. (Abbildung 5-4). Dort liegt die NAD-Konzentration, bei der die Hälfte der Maximalaktivität der Zellen erreicht ist, ungefähr bei 0,1 mM. Signifikant erhöht ist der scheinbare K<sub>m</sub>-Wert des Formiates bei den Ganzzellimmobilisaten. Dieser liegt bei der freien FDH bei 8,7 mM und bei den ganzen Zellen bei ungefähr 150 mM. Dahingegen scheint die Aktivität der Zelle selbst bei geringen TMP-Konzentrationen nicht nachzulassen, obwohl der K<sub>m</sub>-Wert der LeuDH für TMP bei 22 mM liegt. Dies könnte daran liegen, dass die LeuDH in 6fach höherer Aktivität als die FDH in der Zelle vorliegt [103], so dass die FDH geschwindigkeitslimitierend für die Gesamtreaktion in der Zelle ist. Damit kann die LeuDH ihre Maximalgeschwindigkeit gar nicht erreichen und die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion sinkt auch bei kleinen TMP-Konzentrationen nicht.

Im vorliegenden Fall handelt es sich um ganze Zellen mit 2 unterschiedlichen Enzymen, die an der Reaktion beteiligt sind. Es ist daher nur schwer möglich, eine Modellierung der

Enzymkinetiken der Zelle vorzunehmen. Einerseits ist schon die Modellierung einer Reaktion mit 2 Enzymen sehr komplex [73], da z. B. die Konzentration des Substrates des einen Enzymes von der Reaktionsgeschwindigkeit des anderen Enzyms abhängt oder sich die Substrat- und Produktkonzentrationen unterschiedlich auf die Enzyme auswirken. Weiterhin wurde in dieser Arbeit nicht die genaue Menge der gebildeten Enzyme in den Zellen bestimmt, so dass nicht bekannt ist, wie viel des Enzyms LeuDH und des Enzyms FDH von der Zelle tatsächlich gebildet wurde. Dies bzw. das Mengenverhältnis von FDH zu LeuDH ist aber für eine Modellierung der Kinetik der Reaktion notwendig. Zusätzlich können in der Zelle andere Substratkonzentrationen herrschen als im umgebenden Medium. Aus diesen Gründen wurden die erhaltenen Kurven in Abbildung 5-4 nur für die Beschreibung der Immobilisate benutzt.

Bezüglich des NADs (siehe Abbildung 5-4 A) ist die maximale Aktivität zwar erst bei einer NAD-Konzentration von 3 mM erreicht, bei einer Verringerung der NAD-Konzentration um das 15fache auf 0,2 mM allerdings werden immer noch 60 % der Maximalaktivität erreicht. Dies macht eine Reduktion der Cofaktorkonzentration auf 0,2 mM trotz verringerter Aktivität wirtschaftlich. Dies wurde in Kapitel 5.3.3 anhand von Carrageenanimobilisaten getestet.

Leider haben die Immobilisate aus Alginat zwei große Nachteile:

- **Notwendigkeit der Zugabe von Calciumchlorid:** dadurch fällt durch das entstehende  $\text{CO}_2$  der FDH-Reaktion Calciumcarbonat aus (siehe auch Kapitel 5.2.2). Dies ist in dem Produktionsprozess sehr störend.
- **Destabilisierung der Alginatkugeln durch Salze wie Ammonium, Natrium oder Phosphationen:** dies bewirkt, dass einerseits kein Kaliumphosphatpuffer verwendet werden kann. Weiterhin ist es nicht möglich, die Konzentration an Substraten wie Ammonium unbegrenzt zu erhöhen oder größere Mengen an Natronlauge zur pH-Regulierung hinzuzugeben. In einem Produktionsbetrieb sind hohe Substratkonzentrationen sowie der Einsatz kostengünstiger Säuren und Laugen wünschenswert.

Daher wird im Folgenden der Einschluss der Ganzzellkatalysatoren in Carrageenankugeln untersucht.

### **5.3 Einschluss der Zellen in Carrageenan-Kugeln**

In dieser Immobilisierungsmethode werden die Zellen ebenfalls in ein ionotropes Gel eingeschlossen. Im Gegensatz zu der Immobilisierung mit Alginat wird das ionotrope Gel aus Carrageenan nicht nur mit Hilfe von Calciumionen stabilisiert, sondern auch durch

anderen Ionen wie Kalium oder Ammonium. Dies hat den Vorteil, dass kein Calcium zu den Einsätzen mit Carrageenankugeln hinzu gegeben werden muss, da die im Umsatzmedium vorhandenen Salze die Carrageenankugeln ausreichend stabilisieren. Damit kann sich kein Niederschlag aus Calciumcarbonat bilden. Weiterhin tragen hohe Substrat- und damit Salzkonzentrationen nicht zur Destabilisierung der Kugeln, sondern zur Stabilisierung der Kugeln bei. In den Zellaktivitätstests kann darüber hinaus anstelle des teuren MOPSO-Puffers der kostengünstigere Kaliumphosphatpuffer benutzt werden. In den Versuchen dieser Arbeit wurde der MOPSO-Puffer jedoch beibehalten, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen der Alginatkugeln zu sichern. Es wurde lediglich Kaliumchlorid zur Stabilisierung hinzu gegeben. Die Herstellung der Immobilisate ist in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben.

### **5.3.1 Mehrfacheinsatz von 2% igen Carrageenan-Kugeln**

In Vorversuchen waren die für diese Konzentration an Carrageenan günstigsten Verkapselungsbedingungen bestimmt worden. Der Einschluß der Zellen erfolgte in Kugeln zweier unterschiedlicher Durchmesser. Die beladenen Kugeln wurden im Mehrfacheinsatz getestet. Durch die unterschiedlichen Kugelgrößen sollte der Einfluß der Kugelgeometrie auf Aktivität und Stabilität der Zellen ermittelt werden. Die Herstellung der Immobilisate erfolgte gemäß Kapitel 3.3.2 – 3.3.6 (Herstellung der Zellen) sowie Kapitel 3.2.5.2 und den in Tabelle 3-3 angegebenen Bedingungen (Immobilisierung der Zellen).

Die Aktivität der Kugeln wurde gemäß Kapitel 3.3.7 und 3.3.7.2 gemessen und ein Einsatz dauerte ungefähr 2-3 Stunden. Der Medienwechsel zwischen den einzelnen Einsätzen erfolgte gemäß Kapitel 3.3.8. Die Zeit von der Herstellung der Kugeln bis zum letzten Einsatz betrug 11 Tage. Während der Nacht wurden die Kugeln bei 4 °C in Aufbewahrungspuffer (siehe Kapitel 3.3.2) aufbewahrt.

Das Ergebnis des Mehrfacheinsatzes ist in Abbildung 5-5 zu sehen. Dort ist ersichtlich, dass die Aktivität der größeren Immobilisate um 25 % geringer ist als die Aktivität der kleineren Immobilisate. Hierfür ist möglicherweise eine geringe Diffusionslimitierung verantwortlich.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die Aktivität sowohl der großen als auch der kleinen Kugeln mit der Anzahl der Einsätze abnimmt. Dies liegt wahrscheinlich an der mechanischen Instabilität der Kugeln. Wie in den Fotos in Abbildung 5-5 zu sehen ist, sind die Kugeln nach allen Einsätzen sehr beschädigt. Dadurch können die Zellen in das umliegende Medium gelangen und gehen damit für den nächsten Einsatz verloren. Die Zerstörung der Kugeln könnte durch das Benutzen eines Magnetrührers verursacht worden sein. Der Rührfisch des Magnetrührers kann am Boden des Umsatzgefäßes sehr hohe Scherkräfte entwickeln,

welche die Kugeln mechanisch zerstören können. Auch ist es möglich, dass die Carrageenankonzentration nicht hoch genug ist und damit mechanisch instabilere Kugeln entstehen. Daher wurde in den weiteren Versuchen die Konzentration des Carrageenans auf 3 % erhöht und für den Zelleinsatz ein Scheibenrührer (Überkopfrührer) benutzt.

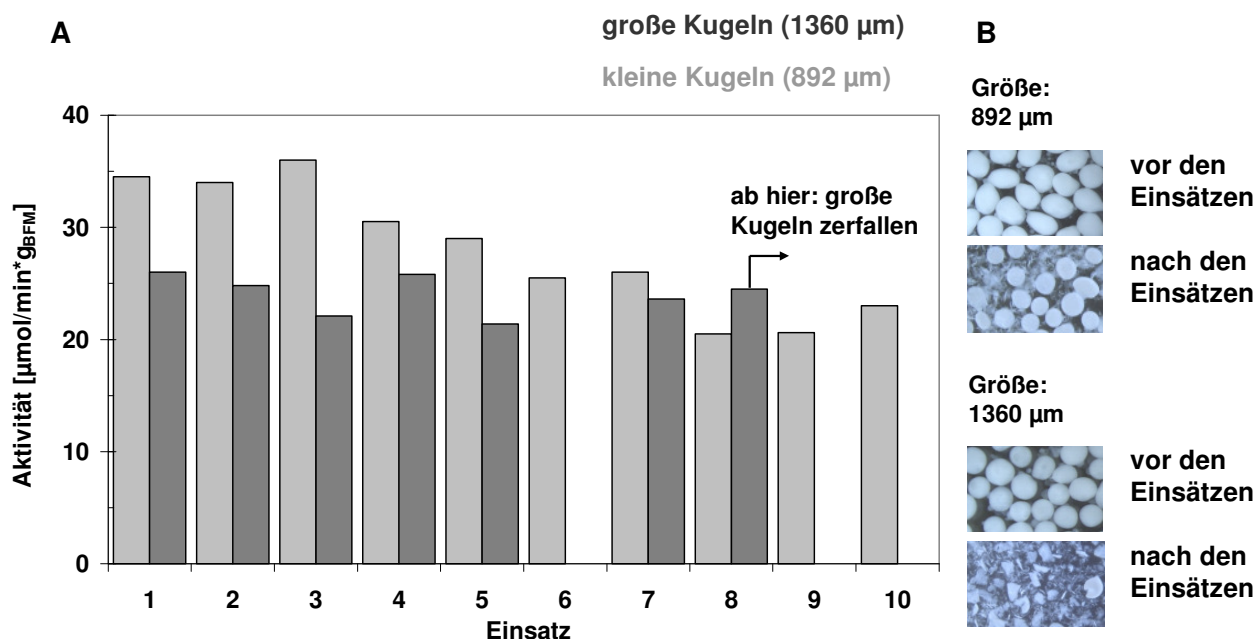


Abbildung 5-5: A) Zellaktivität während eines Mehrfacheinsatzes von in 2%iges Carrageenan verkapselten Zellen  
B) Carrageenan-Kugeln jeweils vor und nach den Einsätzen

### 5.3.2 Mehrfacheinsatz von 3% igen Carrageenan-Kugeln

Um die Kugelzerstörung des letzten Versuches zu vermeiden, wurde die Carrageenan-Konzentration von 2 auf 3 % erhöht und zusätzlich in einem Rührsystem mit einem Scheibenrührer gerührt. Höhere Carrageenan-Konzentrationen waren nicht möglich, da die Viskosität so stark anstieg, dass mit Hilfe der Abblasapparatur keine Kugeln mehr hergestellt werden konnten. Auch die Diffusionslimitierung würde möglicherweise aufgrund des dichteren Polymernetzwerkes zu stark ansteigen. Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.3.2 – 3.3.6 beschrieben hergestellt und wie Kapitel 3.2.5.2 dargestellt immobilisiert. Es wurden zur Verkapselung die in Tabelle 3-3 aufgelisteten Bedingungen verwendet.

Die Aktivität der hergestellten, freien Zellen wurde gemäß Kapitel 3.3.7 und 3.3.7.1 und die Aktivität der Zellimmobilisate gemäß Kapitel 3.3.7 und 3.3.7.2 gemessen. Damit konnte die Aktivität der freien Zellen mit der Aktivität der Carrageenankugeln verglichen werden. Weiterhin wurden die Kugeln 11 Mal wiedereingesetzt, um die Langzeitaktivität und die mechanische Stabilität der Immobilisate zu testen. Zwischen den einzelnen Einsätzen wurde



das Medium gemäß Kapitel 3.3.8 gewechselt. Die Zeit von der Herstellung der Kugeln bis zum letzten Einsatz betrug 9 Tage. Die Kugeln wurden während der Nacht bei 4 °C in Aufbewahrungspuffer (s. Kapitel 3.3.2) aufbewahrt.

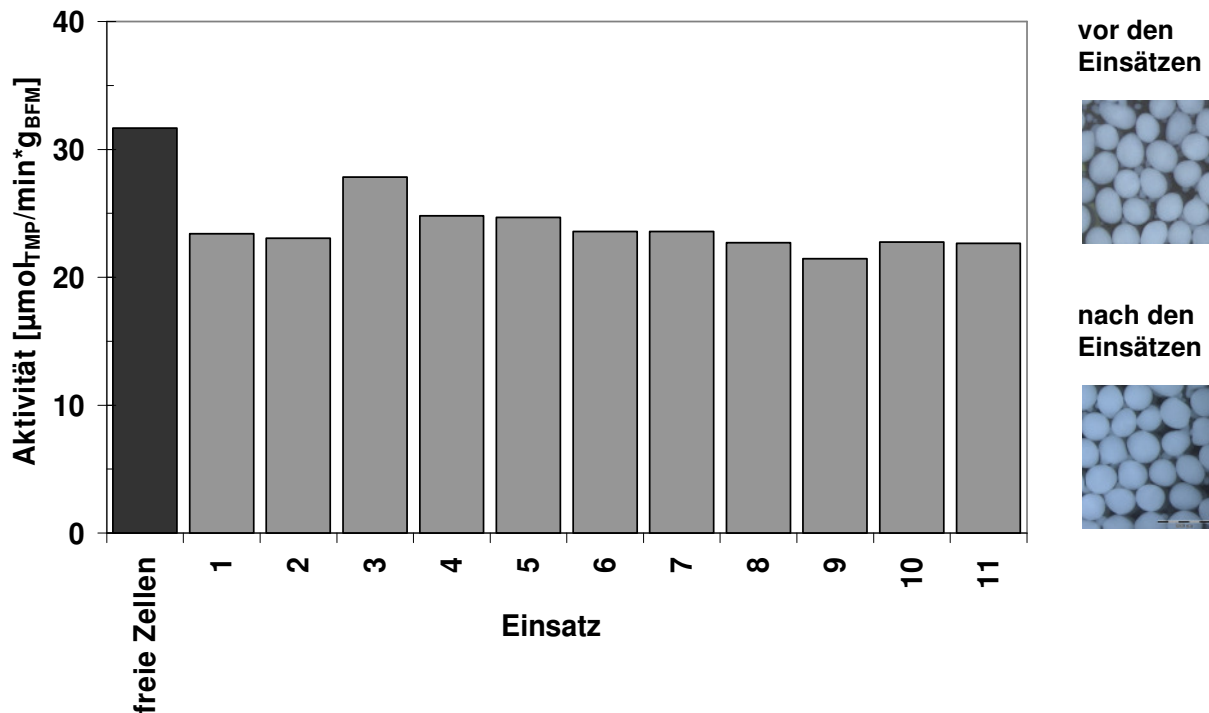


Abbildung 5-6: A) Zellaktivität während eines Mehrfacheinsatzes von in 3%iges Carrageenan verkapselten Zellen  
B) Carrageenan-Kugeln vor und nach den Einsätzen

Das Ergebnis ist in Abbildung 5-6 zu sehen. Dort ist zu erkennen, dass die Aktivität der Kugeln unter diesen Bedingungen im Laufe von 11 Einsätzen nicht signifikant abnimmt, d.h. die Aktivität der in den Kugeln immobilisierten Zellen bleibt stabil. Auch auf den Fotos der Kugeln vor und nach den Einsätzen ist keine mechanische Zerstörung der Kugeln zu erkennen. Die Aktivität der immobilisierten Zellen beträgt noch 75 % der freien Zellen, d.h. es liegt nur ein leichter Abfall der Aktivität vor, welcher wahrscheinlich auf eine geringe Diffusionslimitierung zurückzuführen ist.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Verkapselung in 3%igem Carrageenan und die Verwendung eines Scheibenrührers während des Einsatzes durchaus eine geeignete Immobilisierungsmethode für diese Ganzzellkatalysatoren ist.

Im Weiteren soll der Einsatz dieser Immobilisate unter ausgewählten Bedingungen getestet werden, die aus wirtschaftlicher Sicht denen einer zukünftigen industriellen Produktion von L-tert-Leucin entsprechen. Wesentlich schienen in diesem Zusammenhang die Verringerung

der Konzentration des Cofaktors NAD, das Erhöhen der Substratkonzentration des TMP und der Mehrfacheinsatz des Immobilisats Carrageenan-Kugeln zu sein.

### 5.3.3 Mehrfacheinsatz von 3% igen Carrageenan-Kugeln mit 0,2 mM NAD und 450 mM TMP

Da NAD relativ teuer ist, soll überprüft werden, ob es möglich ist, die bisherige NAD-Konzentration von 4 mM auf 0,2 mM zu erniedrigen. Ein völliges Weglassen des NAD's ist nicht möglich. Die Zellen produzieren zwar während des Zellwachstums auch selber NAD. Jedoch wird die Zellwand mit Toluol perforiert, damit die Substanzen TMP und L-*tert*-Leucin durch die Zellwand gelangen können. Dadurch kann aber auch das von der Zelle produzierte NAD hinausgelangen und wird während der Herstellung und des Waschvorganges der Zellen hinausgewaschen.

Das TMP soll auf eine Konzentration von 450 mM erhöht werden. Das hat den Vorteil, dass bei einem Vollumsatz des TMP's zu L-*tert*-Leucin die Konzentration des L-*tert*-Leucins höher ist. Damit können die Aufreinigungskosten in der nachfolgenden Aufreinigung reduziert werden, was das Verfahren wirtschaftlicher macht. Da das Verhältnis von TMP zu Ammoniumformiat 1:3 sein sollte (mündliche Aussage des Industriepartners), wurde die Ammoniumformiatkonzentration auf 1350 mM erhöht. Die Bedingungen waren daher folgendermaßen:

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>TMP:</b>                    | <b>450 mM</b>   |
| <b>NH<sub>4</sub>-Formiat:</b> | <b>1350 mM</b>  |
| <b>NAD:</b>                    | <b>0,2 mM</b>   |
| MOPSO-Puffer:                  | 100 mM  |
| KCl:                           | 200 mM  |
| MgCl <sub>2</sub> :            | 1 mM  |
| Beladung:                      | 0,03 g <sub>BFM</sub> /ml <sub>Medium</sub><br>=> 0,2 g <sub>Kugeln</sub> /ml <sub>Medium</sub> |
| Temperatur:                    | 30 °C   |
| pH-Wert:                       | 7 +- 0,2 (mit NaOH/HCl)   |

Mit diesen Änderungen kann auch die turn-over-Zahl (siehe Formel 3.1.), d.h. die Menge produzierten L-*tert*-Leucin pro Menge eingesetzten NAD's, erhöht werden. Dies ist ein Maß für eine effektivere Cofaktorregenerierung.

Im Folgenden wurden zunächst die Zellen gemäß Kapitel 3.3.2-3.3.6 hergestellt und entsprechend Kapitel 3.2.5.2 und Tabelle 3-3 in 3%iges Carrageenan verkapselt. Zunächst

wurde die Aktivität der freien Zellen gemäß Kapitel 3.3.7 und 3.3.7.1 unter Standardbedingungen (4 mM NAD, 100 mM TMP, 300 mM Ammoniumformiat) und mit geänderten Substratkonzentrationen (0,2 mM NAD, 450 mM TMP und 1350 mM Ammoniumformiat) gemessen. Weiterhin wurde die Aktivität der Immobilisate gemäß Kapitel 3.3.7 und 3.3.7.2 mit den geänderten Substratkonzentrationen (0,2 mM NAD, 450 mM TMP und 1350 mM Ammoniumformiat) gemessen und die Langzeitaktivität sowie die mechanische Stabilität dieser Immobilisate im Mehrfacheinsatz mit den geänderten Substratkonzentrationen getestet. Ein Einsatz dauerte 1-3 Tage und die gesamte Dauer der Zellumsätze betrug 408 Stunden, d.h. 17 Tage. Der Medienwechsel zwischen den einzelnen Einsätzen erfolgte wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben. Während der Nacht wurden die Kugeln bei 4 °C in Aufbewahrungspuffer (siehe Kapitel 3.3.2) aufbewahrt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 5-7 dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Aktivität der Kugeln über den relativ großen Zeitraum von 17 Tagen stabil bleibt. Es konnte, obwohl sich die Zellen die gesamte Zeit im Umsatzmedium bei 30 °C befanden, kein Abfall der Aktivität festgestellt werden. Auch die Kugeln selber zeigen keinerlei Verschleißerscheinungen. Wie auf den Fotos zu sehen ist, sind die Kugeln nach den Einsätzen immer noch genauso formstabil wie zu Beginn.

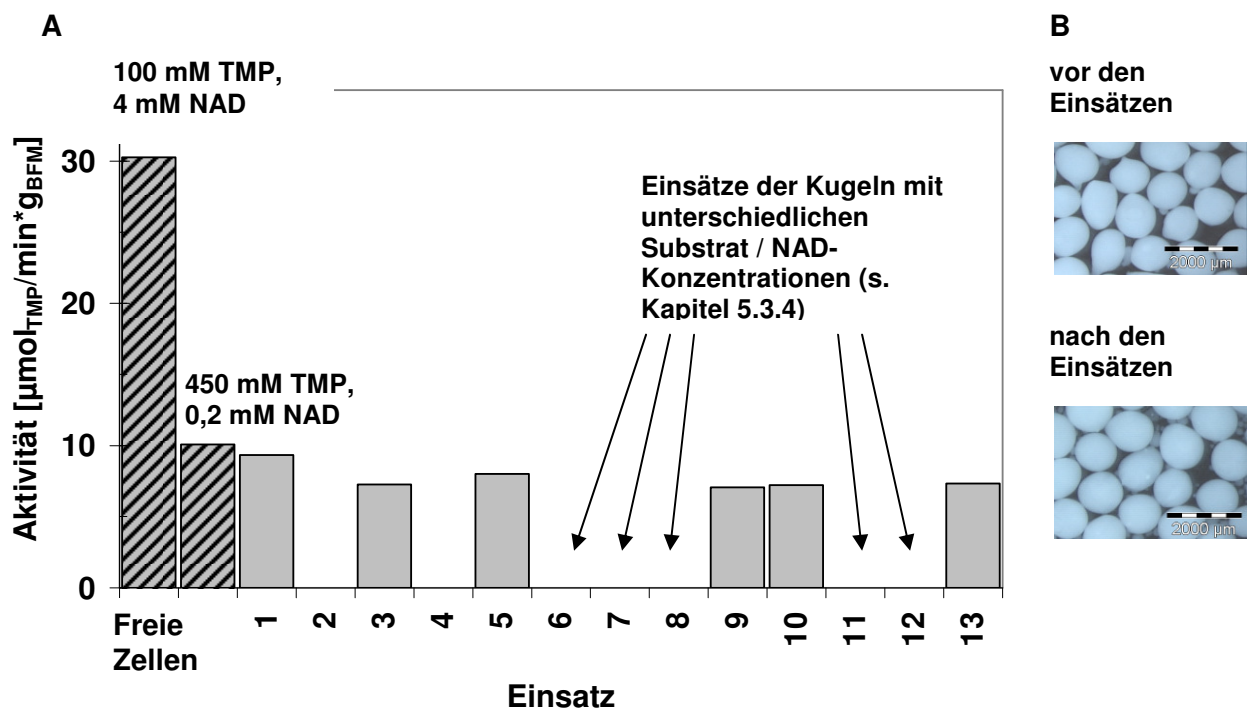


Abbildung 5-7:

A) Zellaktivität während eines Mehrfacheinsatzes von in 3%iges Carrageenan verkapselten Zellen mit 450 mM TMP und 0,2 mM NAD  
 B) Carrageenan-Kugeln vor und nach den Einsätzen

Allerdings ist auch zu sehen, dass die Aktivität der Kugeln mit erhöhter TMP-Konzentration und erniedrigter NAD-Konzentration stark abnimmt. Dies lässt sich nicht nur für die Kugeln feststellen, sondern auch bei den freien Zellen. Möglicherweise wirkt die hohe TMP-Konzentration auf die Zellen hemmend. Auch die geringe NAD-Konzentration kann für den Abfall der Aktivität mitverantwortlich sein. Der  $K_m$ -Wert der FDH, die in diese Zellen hineinkloniert wurde, liegt bei 0,08 mM. Die Konzentration von 0,2 mM liegt nur ungefähr um das Doppelte höher, so dass die freie FDH in diesem Konzentrationsbereich noch nicht ihre vollständige Aktivität erreicht hat. Allerdings bezieht sich dieses nur auf die freie FDH, in der Zelle kann dieses anders aussehen.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss unterschiedlichen Konzentrationen der Substrate auf die Aktivität der freien Zellen untersucht. Weiterhin wurde der Einfluß der NAD-Konzentration auf die Aktivität der Carrageenankugeln untersucht, wobei die restlichen Bedingungen im Vergleich zu den anderen Versuchen gleich geblieben waren (siehe Kapitel 5.3.2).

Darüberhinaus wurde in diesem Versuch festgestellt, dass unter diesen Bedingungen (erhöhte TMP- und Ammoniumformiat- sowie erniedrigte NAD-Konzentrationen) kein Vollumsatz des Substrates TMP möglich ist. Dies ist in den TMP-Verbrauchskurven einiger Einsätze innerhalb des Mehrfacheinsatzes zu erkennen, welche in Abbildung 5-8 exemplarisch dargestellt sind.

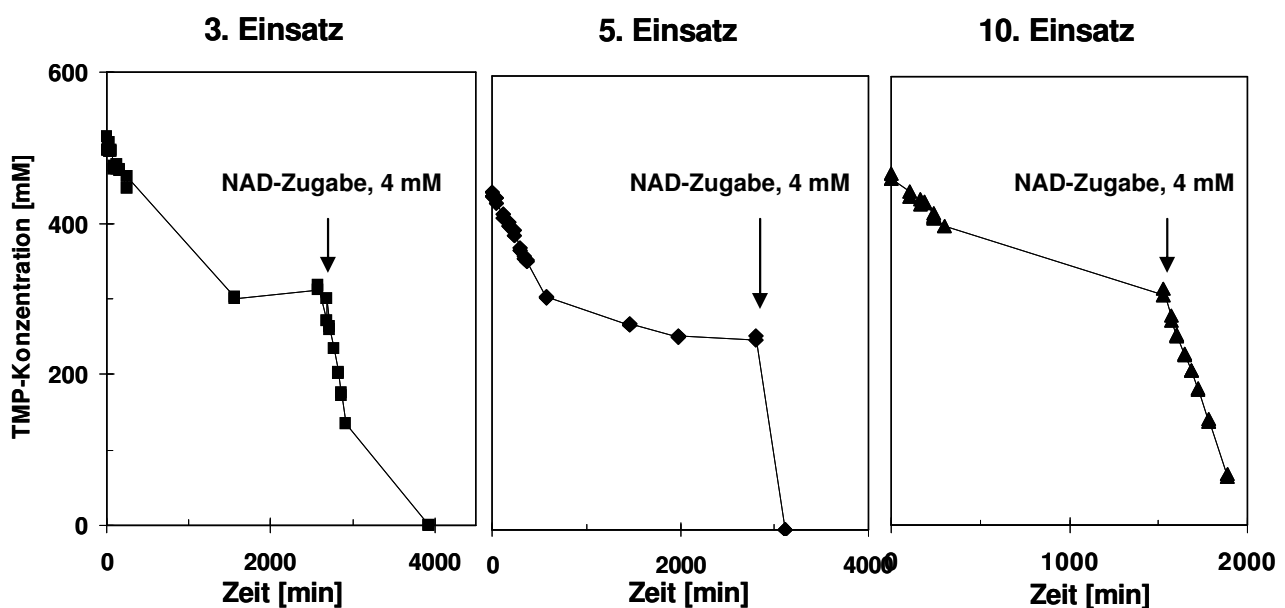


Abbildung 5-8: TMP-Verbrauchskurven während einiger Einsätze (Einsatz 3, 5 und 10) innerhalb des Mehrfacheinsatzes

Nach ca. 1600 min bzw. nach dem Umsetzen von 200 mM TMP verringert sich die Zellaktivität (Umsatz bis dann = 40 %) auf Null. Fügt man allerdings wieder NAD zu (z.B. 4 mM), steigt die Aktivität 21-22 [ $\mu\text{mol}_{\text{TMP}}/\text{g}_{\text{BFM}} \cdot \text{min}$ ] an und sämtliches Substrat wird umgesetzt. Das ist unabhängig davon, ob es ein Einsatz am Beginn des Mehrfacheinsatzes ist (z.B. 3. Einsatz) oder am Ende des Mehrfacheinsatzes (z.B. 10. Einsatz). Dies kann bedeuten, dass im Laufe der Reaktion das NAD inaktiviert bzw. so verändert wird, dass es für die Reaktion der FDH/LeuDH nicht mehr zur Verfügung steht. Diese Vermutung wird in Kapitel 5.4 weiter untersucht werden.

#### 5.3.4 Einfluß der Substratkonzentrationen auf die Zellaktivität

Da vor allem die hohe TMP- und Ammoniumformiat-Konzentration und die niedrige NAD-Konzentration die Aktivität der Zellen beeinflussen zu scheinen, wurde zunächst bei zwei unterschiedlichen TMP- und Ammoniumformiat-Konzentrationen die NAD-Konzentration variiert und die Aktivität gemessen. Dazu wurden die Ganzzellkatalysatoren gemäß Kapitel 3.3.2-3.3.6 hergestellt und die Aktivität dieser freien Zellen gemäß Kapitel 3.3.7 und 3.3.7.1 gemessen, wobei die Substratkonzentrationen variierten. Die TMP- und Ammoniumformiatkonzentration betrug in der einen Versuchsreihe 100 mM (c(TMP)) und 300 mM (C(NH<sub>4</sub>-Formiat)) und in der anderen Versuchsreihe 450 mM (c(TMP)) und 1350 mM (C(NH<sub>4</sub>-Formiat)). Die NAD-Konzentration wurde jeweils im Bereich von 0-4 mM variiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-9 B und D dargestellt. Zusätzlich wurde dieses Ergebnis mit dem Ergebnis von immobilisierten Zellen verglichen. Die Werte für die Carrageenanimmobilisate wurden aus den Mehrfachmessungen in Kapitel 5.3.3 genommen. Für die Alginatimmobilisate standen die Messungen aus Kapitel 5.2.3 (s. Abbildung 5-4 A) zur Verfügung. Diese Werte sind in Abbildung 5-9 A und C abgebildet. Aus dem Verlauf der Aktivität in Abhängigkeit der NAD-Konzentration wurden jeweils die  $K_m$ -Werte und  $v_{\text{max}}$  berechnet. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die hier ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten nur scheinbare Konstanten sind. Die eigentliche Michaelis-Menten-Kinetik gilt für die Charakterisierung von freien Enzymen mit einer 1-Enzymreaktion. Jedoch lassen sich die Werte gut für den Vergleich der Kurven heranziehen.

Das Ergebnis ist in Abbildung 5-9 zu sehen. Da der Regressionskoeffizient in allen 4 Kurven größer als 0,96 ist, wird davon ausgegangen, dass eine Kurvenangleichung entsprechend einer Michaelis-Menten-Kinetik vertretbar ist. Es ist sehr gut zu erkennen, dass der  $K_m$ -Wert, welcher der NAD-Konzentration entspricht, bei der die Aktivität der Zellen 50 % der Maximalaktivität beträgt, vor allem von der TMP- und der Natriumformiat-Konzentration abhängt. Dieser ist bei den Kurven A und B, welche mit 100 mM TMP und 300 mM Natriumformiat durchgeführt wurden, mit 0,1 mM NAD um das 6 bzw. 7 fache geringer als die  $K_m$ -Werte der Kurven C und D. Diese betrugen bei 450 mM TMP und 1350 mM

Natriumformiat jeweils 0,6 und 0,7 mM NAD. Möglicherweise werden die Enzyme (oder eines von ihnen) durch die hohen Substratkonzentrationen in ihrer Bindung an das NAD oder das NADH gehemmt. Die Immobilisate zeigen im Vergleich zu den freien Zellen keinen signifikanten Unterschied im  $K_m$ -Wert. Das bedeutet, dass der Abfall der Aktivität bei einer NAD-Konzentration von 0,2 mM in Kapitel 5.3.3 nicht auf eine Diffusionslimitierung zurückzuführen ist. Der  $K_m$ -Wert, welcher in den Kurven A und B dargestellt ist, entspricht mit 0,1 mM dem  $K_m$ -Wert der freien FDH von 0,074 mM. Dies liegt möglicherweise darin begründet, dass die FDH in 6fach geringerer Aktivität (0,3 U/mg<sub>Protein</sub>) von den Zellen exprimiert wird als die LeuDH (2 U/mg<sub>Protein</sub>) [103]. Dies bewirkt, dass die FDH das geschwindigkeitslimitierende Enzym darstellt und das NAD/NADH-Gleichgewicht auf der Seite des NAD's liegt und sich die NAD-Konzentration der eingesetzten NAD-Konzentration annäherte.

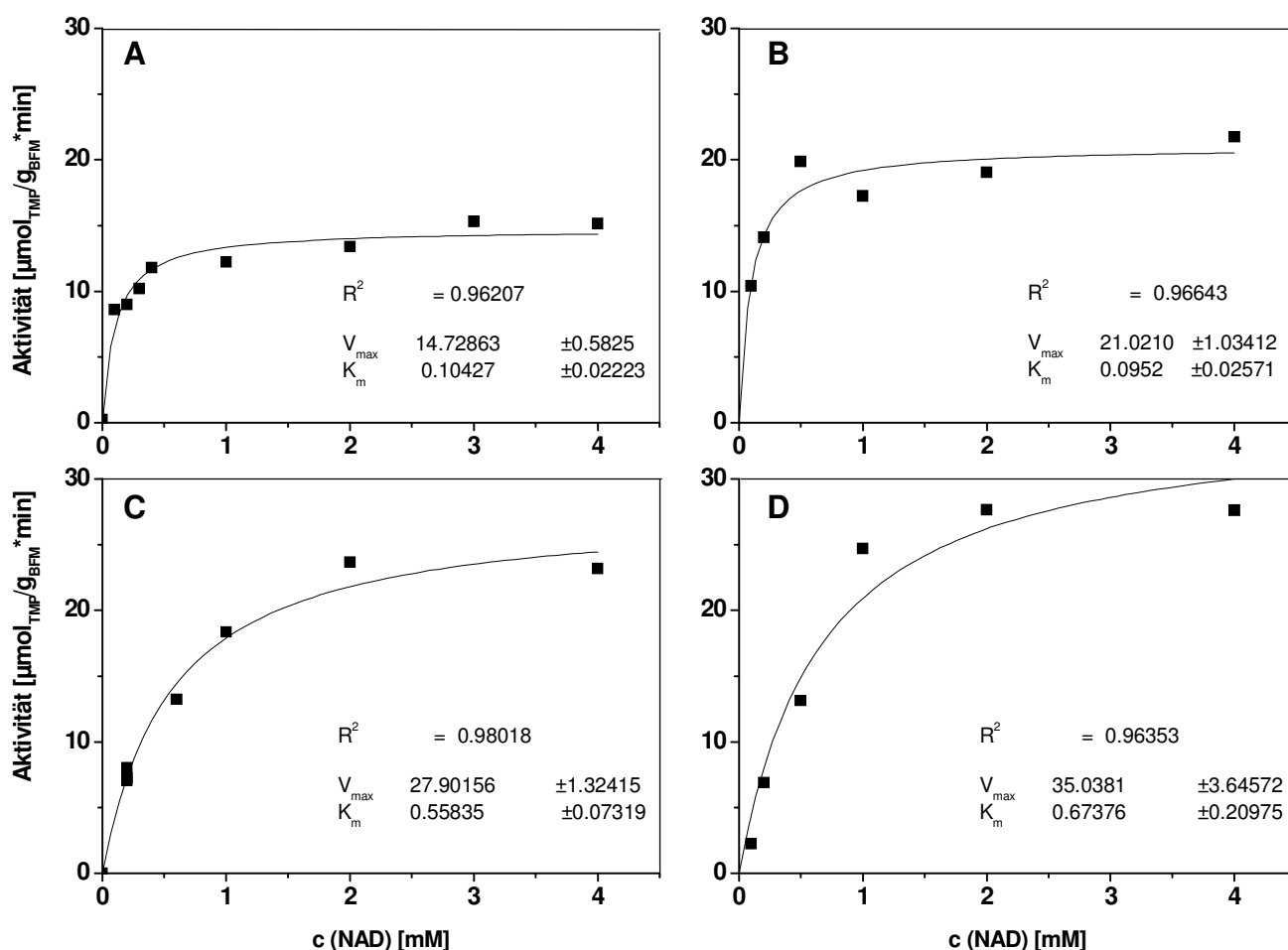


Abbildung 5-9: Vergleich der Abhängigkeit der Aktivität von der NAD-Konzentration bei unterschiedlichen Einschlussmaterialien und TMP/Natriumformiat-Konzentrationen:  
 A. 2% Alginate, 100mM TMP (300 mM Natriumformiat)  
 B. Freie Zellen, 100 mM TMP (300 mM Natriumformiat)  
 C. 3% Carrageenan, 450 mM TMP (1350 mM Natriumformiat)  
 D. Freie Zellen, 450 mM TMP (1350 mM Natriumformiat)

Bezüglich  $v_{\max}$  lassen sich nur Tendenzen erkennen, da einerseits die Unterschiede nicht so signifikant sind wie bei den  $K_m$ -Werten. Außerdem ist  $v_{\max}$  eine Absolutgröße, welche direkt von der Beladung der Immobilisate und den eingesetzten Menge an Zellen abhängt. Diese Größen sind aufgrund von Wäageungenauigkeiten der Biofeuchtmasse und Messungenauigkeiten während der Herstellung sowie kleinen Unterschieden im Wachstum der Zellen fehlerbehaftet. Dadurch können auch die Maximalaktivitäten der einzelnen Chargen etwas schwanken. Es lässt sich jedoch trotzdem feststellen, dass bei hohen Substratkonzentrationen  $v_{\max}$  sowohl bei den freien Zellen als auch bei den immobilisierten Zellen mit 28 bzw. 35 [ $\mu\text{mol}_{\text{TMP}}/\text{g}_{\text{BFM}} \cdot \text{min}$ ] höher ist als bei niedrigen Substratkonzentrationen ( $v_{\max} = 14$  bzw. 21 [ $\mu\text{mol}_{\text{TMP}}/\text{g}_{\text{BFM}} \cdot \text{min}$ ]).

Eine genaue Abhängigkeit der Aktivität der Zellen von den Substratkonzentrationen lässt sich hiermit jedoch noch nicht feststellen, da an der Reaktion insgesamt 4 unterschiedliche Substrate beteiligt sind (NAD/NADH, TMP, Ammonium und Formiat). Jedes dieser Substrate kann in unterschiedlicher Konzentration die Aktivität unterschiedlich beeinflussen, so dass im Folgenden der Einfluß der Substrate unabhängig voneinander untersucht werden muss.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Substratkonzentrationen auf die Aktivität der Zellen wurden mit freien Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zelle gemäß Kapitel 3.3.2 – 3.3.6 hergestellt und die Aktivität dieser Zellen entsprechend Kapitel 3.3.7 und 3.3.7.1 gemessen. Dabei wurden jedoch nicht nur die Standardkonzentrationen der Substrate verwendet, sondern entsprechend Tabelle 5-3 variiert. Die Substrate Ammonium und Formiat wurden zusammen gemessen, um die Anzahl der Versuche zu reduzieren. Folgende Konzentrationen wurden verwendet (s. Tabelle 5-3):

Tabelle 5-3: Verwendete Substratkonzentrationen zur Messung ihres Einflusses auf die Zellaktivität

| TMP    | NAD <sup>+</sup> | NH <sub>4</sub> Formiat |
|--------|------------------|-------------------------|
| 100 mM | 0,2 mM           | 300 mM                  |
| 300 mM | 0,5 mM           | 700 mM                  |
| 500 mM | 1 mM             | 1300 mM                 |
| 700 mM | 4 mM             | 2000 mM                 |

Diese Konzentrationen (Tabelle 5-3) wurden alle miteinander kombiniert, sodaß insgesamt 64 Versuche durchgeführt und die jeweilige Zellaktivität gemessen wurden. Dabei wurden unterschiedliche Hemmeffekte der einzelnen Substrate festgestellt, welche jedoch stark von

den Konzentrationen der anderen Substrate abhängen sowie konzentrationsabhängige Aktivitätssteigerungen. Konkret wurde Folgendes festgestellt:

1. **Ammoniumformiat:** ab einer Konzentration von 2000 mM ist eine Hemmung der Zellaktivität festzustellen. Dies ist vor allem bei niedrigen NAD-Konzentrationen zu beobachten. Unterhalb von 2000 mM jedoch ist mit steigender Konzentration eine Aktivitätszunahme zu beobachten. Anzumerken ist hierbei, dass in den ähnlichen Versuchen mit Alginatimmobilisaten (siehe Kapitel 5.2.3) eine Hemmung durch Ammoniumchlorid schon bei geringen Konzentrationen beobachtet wurde.
2. **TMP:** Auch hohe TMP-Konzentrationen scheint eine Hemmwirkung auf den Ganzzellkatalysator zu besitzen, auch wiederum vor allem bei kleinen NAD-Konzentrationen.
3. **NAD:** Ein Hemmeffekt von NAD konnte bei hohen NAD-Konzentrationen nicht festgestellt werden. Allerdings ergeben, je nach den Konzentrationen von Ammoniumformiat und TMP, geringere NAD-Konzentrationen auch geringere Aktivitäten.

Die höchsten Aktivitäten wurden dabei bei folgenden, in Tabelle 5-4 dargestellten Kombinationen gemessen.

Tabelle 5-4: Kombinationen der Substratkonzentrationen mit den höchsten Aktivitäten

| Versuch No. | TMP [mM] | NAD [mM] | Ammoniumformiat [mM] | Aktivität [ $\mu\text{mol}_{\text{TMP}} / \text{g}_{\text{BFM}} \cdot \text{min}$ ] |
|-------------|----------|----------|----------------------|---|
| 1           | 100      | 0,2      | 1300                 | 16  |
| 2           | 100      | 0,5      | 1300                 | 18  |
| 3           | 100      | 1        | 700                  | 19  |
| 4           | 500      | 0,2      | 1300                 | 9   |
| 5           | 500      | 0,5      | 1300                 | 14  |
| 6           | 100      | 4        | 1300                 | 20  |
| 7           | 300      | 4        | 2000                 | 20  |

Da aus wirtschaftlicher Sicht geringe Cofaktorkonzentrationen und hohe Eduktkonzentrationen günstig sind, sind die Kombinationen in Versuch 1 oder 5 am besten geeignet. Sie könnten ein Kompromiss zwischen guter Zellaktivität, niedriger Cofaktorkonzentration und hoher Substratkonzentrationen sein. Für eine genauere Beschreibung und eine Modellierung der Kinetik der Reaktion in den Zellen waren die Daten



jedoch aufgrund der relativ geringen Datenmenge von nur 4 Konzentrationen pro Substrat und den Meßungenauigkeiten nicht geeignet.

#### **5.4 Untersuchung zum unvollständigen TMP-Umsatz bei 450 mM TMP und 0,2 mM NAD**

Da es, wie in Kapitel 5.3.3 gezeigt worden ist, nicht möglich ist, mit einer TMP-Konzentration von 450 mM und einer NAD-Konzentration von 0,2 mM einen Vollumsatz des TMPs zu erreichen, wurde dieses Phänomen weiter untersucht. Es konnte dort nur eine turn-over Zahl des NAD's/NADH's von 1000 erreicht werden, da nach dem Umsatz von ca. 200 mM TMP erneut NAD hinzugegeben werden musste, um das gesamte TMP umzusetzen. Bei den freien Enzymen FDH und LeuDH war die turn-over Zahl im Enzymmembranreaktor jedoch mit ca. 2300 beschrieben [75]. Aus diesem Grund und weil der Umsatz nach der Zugabe von NAD problemlos bis zum Vollumsatz fortgeführt werden konnte, ist zu vermuten, dass der unvollständige Umsatz des TMPs nicht an der Instabilität der Enzyme sondern an der Instabilität des NAD's/NADH's während des Umsatzes liegt. Möglicherweise ist das NAD während des Umsatzes zerfallen oder wurde so verändert, dass es für die Enzyme nicht mehr als Cofaktor zur Verfügung stand. Daher wurde im Folgenden eine Methode entwickelt, mit welcher die Analyse des vorhandenen, für die Enzyme verfügbaren NAD's möglich ist. Damit konnte während eines Umsatzes mit 450 mM TMP und 1350 mM Ammoniumformiat die NAD-Konzentration zu bestimmten Zeiten gemessen werden.

##### **5.4.1 Analyse der NAD-Konzentration während des Umsatzes**

Wie oben beschrieben wurde, ist es notwendig, die Konzentration des verwertbaren NAD's/NADH's während eines Umsatzes zu messen, um die oben genannte Vermutung bestätigen zu können, nach der die Abnahme der Aktivität der Zellen in der Zerstörung des verwertbaren NAD's/NADH's begründet liegt. Dazu muss zunächst eine Analysemethode zur Bestimmung des für die Enzyme verwertbaren NAD's/NADH's gefunden werden, welche dann in einem Zelleinsatz mit 450 mM TMP angewendet werden kann.

##### **5.4.1.1 Aufbau einer Methode zur Bestimmung des von den Enzymen verwertbaren Cofaktors**

Hierbei ist es wichtig, dass nicht nur das Vorhandensein von NAD und NADH festgestellt wird, sondern auch, ob diese Moleküle die biochemische Funktion für die LeuDH und die FDH erfüllen.

In der hier entwickelten Methode wurde ausgenutzt, dass NADH ein spezifisches Extinktionsmaximum bei 340 nm hat. Mit der Verwendung von FDH und LeuDH in der

Testmethode wird gleichzeitig die Verfügbarkeit des Cofaktors für die Enzyme überprüft. Das Prinzip dieser Messung ist in Abbildung 5-10 zusehen.

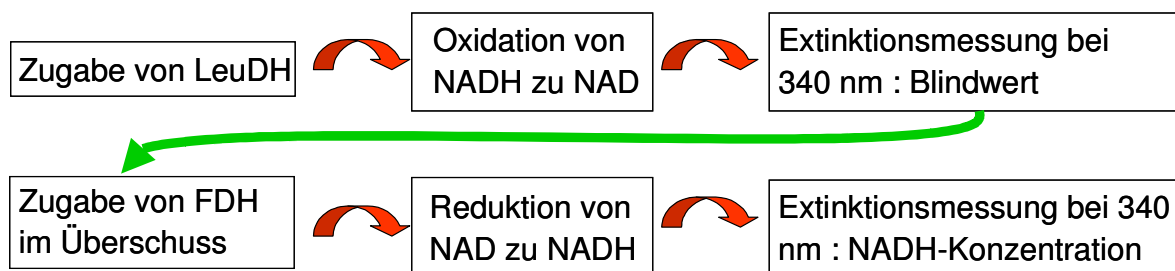


Abbildung 5-10: Prinzip der quantitativen Messung vom Gesamtgehalt an NAD und NADH im Probenüberstand

Zu der zu vermessenden Probe wird zunächst 0,03 U/ml LeuDh dazugegeben. Damit wird sämtliches, in der Probe vorhandenes NADH zu NAD oxidiert und am Photometer kann von der Probe ein Blindwert bei 340 nm genommen werden. Nachdem der Blindwert aufgenommen wurde, wurde die FDH im 62fachen Überschuss (1,8 U/ml) dazugegeben, so dass das NAD wieder vollständig zu NADH reduziert wird. Die FDH muss im Überschuss dazugegeben werden, damit sichergestellt ist, dass das Reaktionsgleichgewicht möglichst vollständig auf der Seite der FDH liegt, so dass alles NAD reduziert wird. Die nun erhaltene Lösung wird wiederum photometrisch bei 340 nm vermessen. Die Extinktionsdifferenz, die sich aus diesem Wert und dem Blindwert ergibt, ist direkt proportional zur Menge an verfügbarem NAD bzw. NADH. Die genauen Meßbedingungen für die Proben und die Kalibration sind in Tabelle 5-5 aufgelistet.

Tabelle 5-5: Messbedingungen der NAD/NADH-Messung

| Probe                        | Kalibration | Probenmessung,<br>Probe mit Substrat | Probenmessung,<br>Probe ohne Substrat |
|------------------------------|-------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| c (TMP)                      | 150 mM      | -                                    | 150 mM                                |
| c (NH <sub>4</sub> -Formiat) | 450 mM      | -                                    | 450 mM                                |
| c (NADH)                     | 0,03-0,1 mM | -                                    | -                                     |
| c (MOPSO-Puffer)             | 100 mM      | 100 mM                               | 100 mM                                |
| Zugabe Probe                 | -           | 0,5 ml auf 1 ml gesamt               | 0,5 ml auf 1 ml gesamt                |
| pH-Wert                      | 8,2         | 7,5-8                                | 7,5-8                                 |
| Temperatur                   | 30 °C       | 30 °C                                | 30 °C                                 |

Eine Extinktionskurve, die während der Erstellung der Kalibrationskurve aufgezeichnet wurde, ist exemplarisch in Abbildung 5-11 gezeigt.

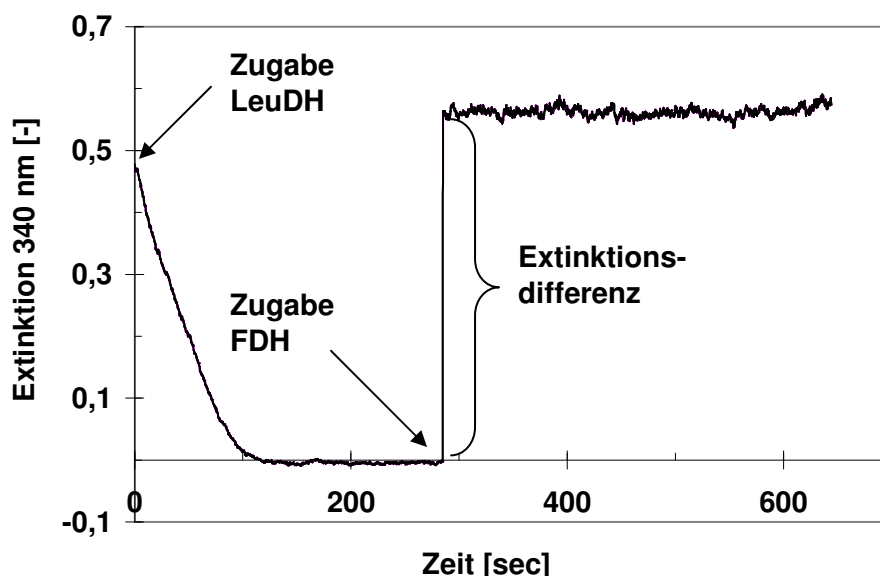


Abbildung 5-11: Extinktionskurve (340nm) einer NAD/NADH-Messung (hier aus der Kalibration)

Für die Kalibration dieser Analysenmethode wurden die Extinktionsdifferenzen bei NADH-Konzentrationen von 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08 und 0,1 mM gemessen und in einer Kalibrationsgerade aufgetragen (s. Abbildung 5-12).

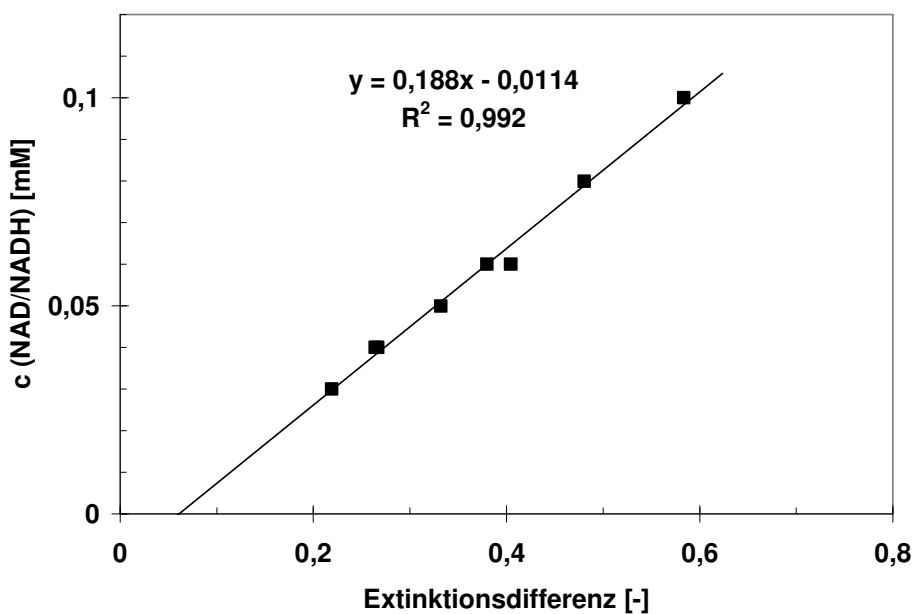


Abbildung 5-12: Kalibrationsgerade zur Messung von NAD/NADH

Wie in Abbildung 5-12 zu sehen ist, ergibt die Kalibrationskurve eine Trendlinie mit einem recht hohen Regressionswert von 0,992. Dies zeigt, dass diese Methode geeignet ist, die Konzentration an verfügbarem NAD/NADH zu bestimmen. Die Bedingungen in der Probe jedoch sind etwas anders als während der Kalibration, so dass überprüft werden muss, ob die Enzyme in der zumessenden Probe genauso arbeiten wie in den Kalibrationslösungen und ein zuverlässiges Ergebnis entsteht. Daher wurde zu einer Probe, in der kein NAD/NADH mehr gemessen werden konnte, 0,1 mM NADH hinzugefügt und die Extinktionskurve (Abbildung 5-13) sowie die Extinktionsdifferenz gemessen.

In Abbildung 5-13 ist zu sehen, dass die Reaktion der LeuDH zur Oxidation des NADHs unter diesen Bedingungen wesentlich langsamer ist als während der Kalibration. Daher ist es notwendig, dass die Inkubationszeit der LeuDH 20 min beträgt, damit eine vollständige Umwandlung von NADH zu NAD gewährleistet wird. Die mit Hilfe der Extinktionsdifferenz und der Kalibrationsgerade berechnete Konzentration von NADH entspricht mit 0,098 mM fast genau der hinzugefügten Menge NADH. Dies zeigt, dass diese Methode geeignet ist, um die Konzentration an verwertbarem Cofaktor in den Proben zu bestimmen.

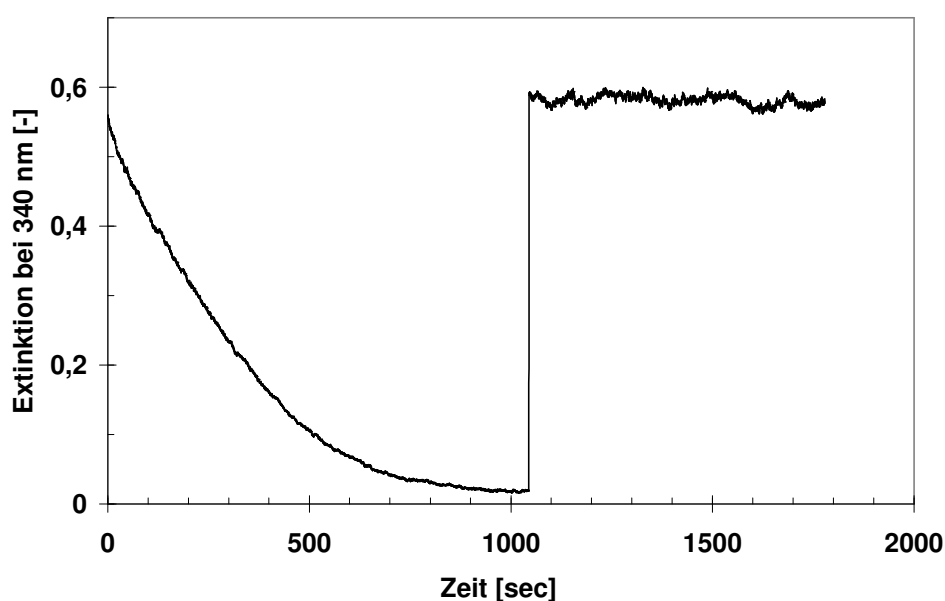


Abbildung 5-13: Extinktionsmessung bei 340 nm einer NADH-Messung im Überstand einer Probe

Im Folgenden wurde daher diese Methode angewendet, um die NAD/NADH-Konzentration während eines Umsatzes mit den in Carrageenan verkapselten Zellen zu bestimmen.

#### 5.4.1.2 Analyse der Cofaktor- Konzentration während des Umsatzes

Es wurden mit Ganzzellkatalysatoren beladene Carrageenankugeln entsprechend Kapitel 3.2.5.2, 3.3.2-3.3.6 und Tabelle 3-3 hergestellt. Von diesen Immobilisiaten wurde wie in Kapitel 3.3.7, 3.3.7.2 und 5.3.3 beschrieben die Aktivität gemessen (0,2 mM NAD, 450 mM TMP und 1350 mM Ammoniumformiat). Ließ die Aktivität der Zellen nach, wurde wieder erneut 0,2 mM NAD dazugegeben und der Umsatz des TMP's weiter verfolgt. Jeweils am Anfang, bei Nachlassen der Aktivität der Zellen und direkt nach dem erneuten Zusatz des Cofaktors wurde eine Probe genommen, in einer Eppendorfzentrifuge bei 13000 rpm für 5 min abzentrifugiert und im Überstand die Konzentration des Cofaktors mittels der in Kapitel 5.4.1.1 beschriebenen Methode bestimmt. In Abbildung 5-14 ist die Umsatzkurve mit der Abnahme des TMP's sowie die jeweilige NAD-Konzentration dargestellt.

Es ist tatsächlich zu sehen, dass, wenn die Aktivität der Zellen auf Null sinkt, kein für die Enzyme verfügbarer Cofaktor mehr vorhanden ist. Wird erneut 0,2 mM NAD dazugegeben, kann dieses in der Probe nachgewiesen werden und die Aktivität der Immobilisate steigt wieder auf die Ausgangsaktivität an. Damit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass der Cofaktor während des Umsatzes so zerstört wird, dass er für die Enzyme nicht mehr verwendbar ist.

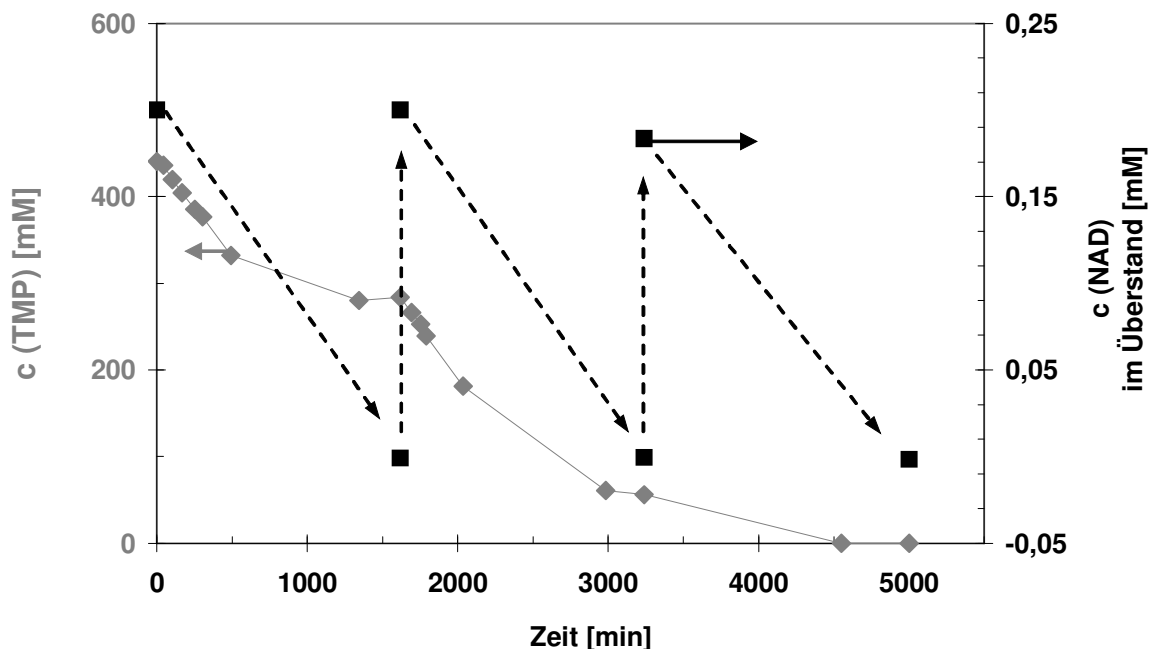


Abbildung 5-14: Verlauf der TMP- und der NAD-Konzentration im Überstand während eines Einsatzes mit Nachdosieren von NAD

In der Abbildung lässt weiterhin erkennen, dass für einen Umsatz von 450 mM TMP ungefähr 0,5 mM NAD benötigt werden. Dies entspricht einem turn-over Faktor von 900. Ähnliches berichten auch Menzel et al. (2004) [103]. Dort wurde getestet, ob die von den Zellen intern gebildete Menge an NAD zur Umsetzung von 900 mM TMP ausreicht. Es wurde festgestellt, dass auch hier ein vollständiger Umsatz von TMP nur unter der Zugabe von 1 mM NAD ein 100%iger Umsatz des TMPs gelingt, was ebenfalls einem turn-over Faktor von 900 entspricht.

Im Folgenden wurde versucht, die Ursachen der Zerstörung des Cofaktors zu ermitteln.

#### **5.4.2 Untersuchungen zur Inaktivierung des Cofaktors**

Um herauszufinden, unter welchen Bedingungen der Cofaktor zerstört wird, wurden der Cofaktor in 6 Versuchen unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkt die Konzentration des verbliebenen aktiven Cofaktors mit Hilfe der oben entwickelten Methode bestimmt. Es wurden dabei 4 verschiedene Kriterien untersucht und variiert:

1. **Auswirkungen der Zellen auf den Cofaktor:** Es ist möglich, dass die Zellen selber Enzyme produzieren, welche den Cofaktor zerstören können.
2. **Auswirkungen der Substrate auf den Cofaktor:** Durch die in Kapitel 5.3.3 und 5.4 verwendeten Substrate könnte der Cofaktor durch unterschiedliche chemische Reaktionen zerstört bzw. inaktiviert worden sein. Dies könnte vor allem deswegen der Fall sein, da in diesem Mehrfacheinsatz sehr hohe Konzentrationen benutzt wurden.
3. **Auswirkungen von Licht auf den Cofaktor:** Da die Zellumsätze alle in normalem Raumlicht durchgeführt wurden und zudem die einzelnen Umsätze eine Dauer von 1-3 Tagen hatten, ist es möglich, dass der Cofaktor durch die Lichteinwirkung zerstört wurde.
4. **Auswirkungen des Sauerstoffes auf den Cofaktor:** Auch die Anwesenheit von Sauerstoff kann den Cofaktor zerstört haben, da, wie in Punkt 3 erwähnt, die Zellumsätze eine sehr lange Dauer hatten.

Die Messungen erfolgten bei 30 °C in Schnappdeckelgläschen mit Magnetrührer und einem Flüssigkeitsvolumen von 15 ml. Die Ansätze fanden unter den in Tabelle 5-6 aufgelisteten Bedingungen statt.

Tabelle 5-6: Versuchsbedingungen zur Untersuchung der NAD/NADH-Inaktivierung

|                  | Zellen                         | Substrate                   | Licht                      | Sauerstoff                            |
|------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| <b>1. Ansatz</b> | aktive Zellen <sup>1</sup>     | ohne Substrate <sup>3</sup> | mit Raumlicht <sup>5</sup> | ohne Sauerstoffausschluß <sup>7</sup> |
| <b>2. Ansatz</b> | aktive Zellen <sup>1</sup>     | ohne Substrate <sup>3</sup> | abgedunkelt <sup>6</sup>   | ohne Sauerstoffausschluß <sup>7</sup> |
| <b>3. Ansatz</b> | aktive Zellen <sup>1</sup>     | mit Substraten <sup>4</sup> | abgedunkelt <sup>6</sup>   | Sauerstoffausschluß <sup>8</sup>      |
| <b>4. Ansatz</b> | abgetötete Zellen <sup>2</sup> | ohne Substrate <sup>3</sup> | mit Raumlicht <sup>5</sup> | ohne Sauerstoffausschluß <sup>7</sup> |
| <b>5. Ansatz</b> | abgetötete Zellen <sup>2</sup> | ohne Substrate <sup>3</sup> | mit Raumlicht <sup>5</sup> | ohne Sauerstoffausschluß <sup>7</sup> |
| <b>6. Ansatz</b> | abgetötete Zellen <sup>2</sup> | mit Substraten <sup>4</sup> | mit Raumlicht <sup>5</sup> | ohne Sauerstoffausschluß <sup>7</sup> |

### Erläuterungen:

<sup>1</sup> : gemäß Kapitel 3.3.2-3.3.6 hergestellte Ganzzellkatalysatoren, 0,033 g<sub>BFM</sub>/ml

<sup>2</sup> : Ganzzellkatalysatoren, welche durch Autoklavieren abgetötet wurden, 0,033 g<sub>BFM</sub>/ml

<sup>3</sup> : Pufferlösung bestehend aus: 0,9 % NaCl, 100 mM MOPSO-Puffer, pH 7,0

<sup>4</sup> : Substratlösung entsprechend Kapitel 5.3.3: 1350 mM NH<sub>4</sub>Formiat, 450 mM TMP, 100 mM MOPSO-Puffer, 200 mM KCl, pH 8,2

<sup>5</sup> : Reaktion ohne Abdunkeln des Reaktionsgefäßes mit Raumlicht

<sup>6</sup> : Abdunkeln des Reaktionsgefäßes mit Alufolie

<sup>7</sup> : Reaktion ohne Austreiben des Sauerstoffes

<sup>8</sup> : Austreiben des Sauerstoffes durch Begasung des Reaktionsgefäßes mit Stickstoff vor und während der Reaktion

Bei allen Ansätzen wurde zunächst die Biomasse in der Substratlösung resuspendiert und die Reaktion dann durch die Zugabe von 0,2 mM NADH. Alle Lösungen und Gefäße, die verwendet wurden, wurden vor dem Einsatz sterilisiert. Die Probenahme erfolgte nach 0, 2, 4, 6 und 24 Stunden. Die Proben wurden in der Eppendorfzentrifuge bei 13000 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und der Überstand entweder sofort auf die Menge NADH gemäß Kapitel 5.4.1.1 hin vermessen oder bei –20 °C für eine spätere Messung aufbewahrt. Es wird davon ausgegangen, dass bei –20 °C keine weitere Reaktion mit NADH stattfindet.

Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 5-15 dargestellt. Wie dort zu sehen ist, zeigen alle Ansätze, welche aktive, nicht abgetötete Zellen enthalten (Ansätze 1-3), schon nach 2 Stunden ein rapiden Abfall der NADH-Konzentration. Dies ist unabhängig davon, ob mit Substraten (Ansätze 1 und 2) oder ohne Substrate (Ansatz 3), mit Raumlicht (Ansatz 1) oder ohne Raumlicht (Ansätze 2 und 3) oder mit Sauerstoff (Ansätze 1 und 2) oder ohne Sauerstoff (Ansatz 3) gearbeitet wurde. Alle Ansätze mit autoklavierten Zellen (Ansätze 4-6)

zeigen kaum einen Abfall. Die Zerstörung des Cofaktors kann also allein auf die Anwesenheit von aktiven Zellen zurückgeführt werden. Keines der anderen 3 untersuchten Kriterien scheint nach Abbildung 5-15 dem Cofaktor signifikant zu schaden.

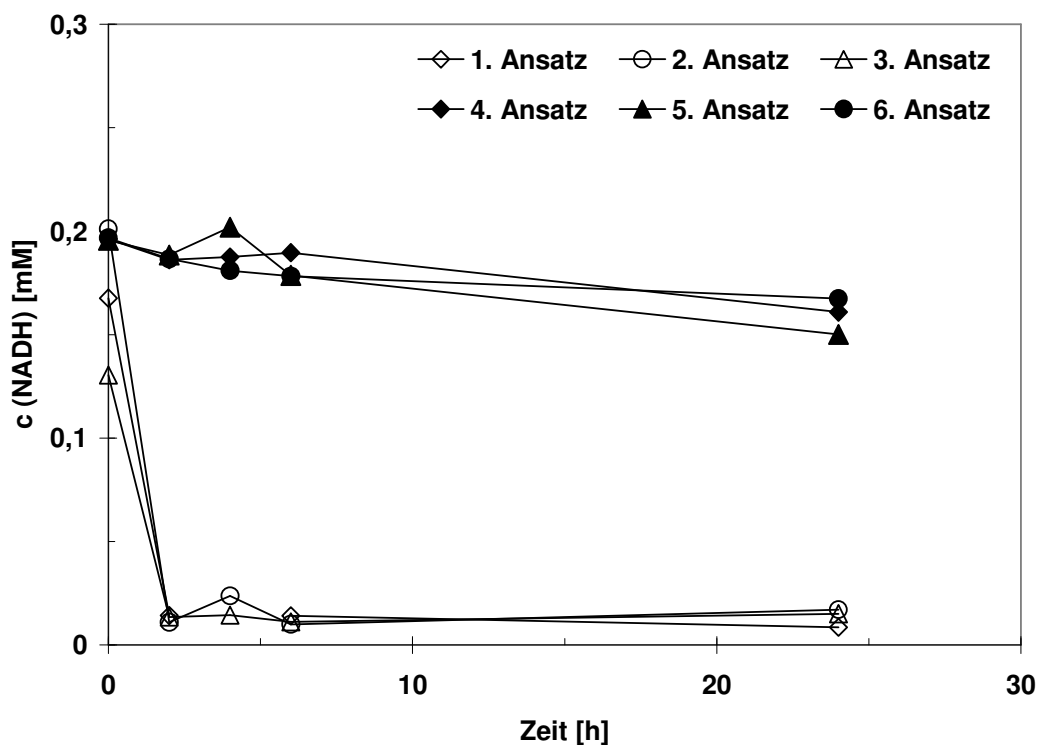


Abbildung 5-15: Verlauf der NADH-Konzentration mit der Zeit bei unterschiedlichen Reaktionsansätzen (ausgefüllte Symbole: autoklavierte Zellen  
leere Symbole: aktive Zellen)

Es ist möglich, dass von den nicht-autoklavierten *E.coli*-Zellen Enzyme gebildet werden, welche NAD zerstören können. Laut Penfound et al. liegt die normale Halbwertszeit von NAD in lebenden Zellen unter aeroben Wachstumsbedingungen bei 90 min [119], da der Cofaktor NAD/NADH dem zellinternen NAD-Metabolismus (Aufbau/Abbau) unterliegt. Die bei der Zersetzung des NADs freiwerdenden Pyridin-Nukleotide werden innerhalb bestimmter Pyridin Nukleotid Zyklen zu anderen wichtigen Zellsubstanzen umgewandelt [122]. Das bedeutet, dass dafür in *E.coli* auch Enzyme existieren, welche NAD abbauen. Die meisten intrazellulären Enzyme dieser Art sind noch nicht identifiziert [122]. Einige Beispiele werden aber bei Penfound et al. 1996 [122] gegeben. Ein Enzym, welches NAD abbauen kann, ist die prokaryontische DNA-Ligase. Sie benutzt die Energie, welche bei der Umwandlung von NAD zu NMN (Nicotinamid-Mononukleotid) frei wird, um Brüche in der doppelsträngigen DNA zu versiegeln [119]. Ein weiteres, NAD-abbauendes Enzym ist die membran-assoziierte NAD-Pyrophosphatase, welche für den extrazellulären Abbau des NADs verantwortlich ist



[122]. Für den intrazellulären Abbau des NADs scheint dieses Enzym jedoch keine Relevanz zu haben. Beide Enzyme haben folgenden Reaktionsweg (siehe Abbildung 5-16).



Abbildung 5-16: Reaktion der DNA-Ligase und der NAD-Pyrophosphatase (aus [122])

Da in dieser Beispielreaktion in Abbildung 5-16 das NAD zwischen den Phosphatresten gespalten wird, ist es gut möglich, dass auch NADH durch diese Enzyme zerstört werden kann. Es gibt auch weitere NAD-abbauende Enzyme, welche jedoch, wie oben erwähnt, noch nicht identifiziert wurden [122]. Möglicherweise wurden während der aeroben Anzucht des hier verwendeten *E.coli* die NAD-abbauenden Enzyme produziert. Durch die Toluolsierung, was eine Zerstörung/Permeabilisierung der Zellwand und eventuell der Zellkompartimente zur Folge hat, könnten diese freigesetzt werden und das im Überstand vorhandene zugeführte NAD oder NADH zerstören. Möglicherweise kann das NADH/NAD auch durch weitere Enzyme, wie Phosphodiesterasen und Phosphatasen, welche den Cofaktor ebenfalls abbauen können [20], inaktiviert worden sein. Die genauen Zusammenhänge sind zurzeit nicht bekannt.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Herstellung chiraler, enantiomerenreiner Alkohole und Amine durch Oxidoreduktasen mit Hilfe enzymatischer Cofaktorregenerierung stellt ein wichtiges Gebiet in der Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe und in der Herstellung von Feinchemikalien dar. Da viele Enzyme, vor allem die hier zur Cofaktorregenerierung verwendete Formiatdehydrogenase, teuer sind, ist es sinnvoll, diese durch Immobilisierung zu stabilisieren und mehrfach wiedereinssetzen zu können. Damit könnten die Produktivität gesteigert und die Prozesskosten gesenkt werden. In dieser Arbeit wurden die Leucindehydrogenase (LeuDH) zur Produktion von L-*tert*-Leucin und die Formiatdehydrogenase (FDH) zur Regenerierung des NADH's untersucht. L-*tert*-Leucin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die in der Medizin als wichtiger Bestandteil zahlreicher potenzieller pharmakologischer Peptid-Wirkstoffe und in der asymmetrischen Synthese verwendet wird. Sie kann auf enzymatischem Weg mit Hilfe der LeuDH durch reduktive Aminierung der Ketosäure Trimethylpyruvat hergestellt werden.

Die Aufgabe bestand in der Immobilisierung der beiden Enzyme in zwei unterschiedlichen Formen: als isolierte Enzyme und in Ganzzellimmobilisaten.

### 6.1 Zusammenfassung

#### 6.1.1 Immobilisierung isolierter Enzyme

Im ersten Teil der Arbeit wurden die LeuDH und die FDH jeweils als isolierte Enzyme immobilisiert. Wie in Kapitel 3.1 bereits erwähnt, liegen bisher noch keine Erkenntnisse über eine zufrieden stellende Immobilisierungsmethode für die FDH sowie für das FDH/LeuDH-System vor. Es wurde in dieser Arbeit zunächst die FDH immobilisiert, weil dieses das empfindlichere Enzym ist. Da mit Hilfe von kovalenter Bindung häufig sehr stabile Immobilisate hergestellt werden können und darüber hinaus auch die immobilisierten Enzyme eine erhöhte Stabilität aufweisen, wurde die FDH mit Hilfe der kostengünstigen Immobilisierungsmaterialien Glutardialdehyd und Chitosan quervernetzt. Da der Aktivitätsverlust durch eine Inaktivierung der FDH mit über 80 % trotz Optimierung für einen technischen Einsatz zu groß war, wurde die FDH, nachdem auch der an sich sehr enzymschonende Einschluß der FDH in Polyelektrolytflocken aufgrund der Instabilität des Immobilisates nicht zufriedenstellend verlief, in Polyelektrolythohlkugeln aus Cellulosesulfat und Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) verkapselt. Damit wurde bei einer Restaktivität von über 23 % und einem Mehrfacheinsatz von 17-mal das bisher beste Ergebnis erreicht. Nachdem herausgefunden wurde, dass der Aktivitätsverlust der eingeschlossenen FDH nicht auf eine Inaktivierung sondern höchstwahrscheinlich auf eine

Diffusionslimitierung des NADs zurückzuführen war, wurden erst die LeuDH einzeln und danach beide Enzyme gemeinsam in Polyelektrolytkugeln verkapselt. Diese Parallelverkapselung der FDH und der LeuDH erbrachte eine Restaktivität von über 80 %. Allerdings waren diese Kapseln in einem Mehrfacheinsatz noch nicht stabil genug und verloren durch Enzymverlust ins Medium stark an Aktivität. In einer weiteren Optimierung konnten durch eine Änderung der Polyelektrolytkonzentration und des pH-Wertes der Polyelektrolyte während der Herstellung stabile Hohlkugeln hergestellt werden, die eine Restaktivität von 80 % besaßen und auch nach einem 7fachen Einsatz keinen Enzymverlust aufwiesen.

Damit wurde eine einfache und kostengünstige Methode gefunden, bei der beide Enzyme gemeinsam mit 80 % Restaktivität und dem Potential zum Langzeiteinsatz immobilisiert werden können.

### **6.1.2 Immobilisierung der Enzymen innerhalb von ganzen Zellen**

Der zweite Teil dieser Arbeit bestand in der Immobilisierung von rekombinanten Zellen, welche durch entsprechende Plasmide in der Lage waren, die beiden Enzyme selbst zu exprimieren. Der Vorteil der Ganzzellimmobilisate gegenüber der Immobilisierung isolierter Enzyme bestand darin, dass die Zellen günstiger herzustellen sind als isolierte Enzyme und in einfach zu handhabende und kostengünstige Matrices wie PVAL, Alginat oder Carrageenan eingeschlossen werden können. Zunächst wurde versucht, die Zellen in Hydrogel-Linsen aus PVAL (Lentikats®) einzuschließen. Diese Methode führte jedoch zu einem Biomasseverlust von fast 50 % nach 3 Einsätzen. Dieser Verlust ist wahrscheinlich auf die hohe Biomassebelastung mit gleichzeitig hoher spezifischer Oberfläche der Lentikats® zurückzuführen. Der Einschluß der Zellen in  $(\text{Ca}^{2+})$ -Alginatevollkugeln zeigte dagegen eine gute Restaktivität der Zellen von fast 90 % und einen stabilen Mehrfacheinsatz ohne Aktivitätsverlust. Allerdings sind die Bildung von unlöslichen Calciumcarbonatsalzen während des Prozesses sowie die Destabilisierung der Alginatkugeln durch Kaliumphosphat und durch das Substrat Ammoniumformiat von großem Nachteil.

Die beste Immobilisierungsmethode war der Einschluss in  $(\text{K}^+/\text{NH}_4^+)$ -Carrageenankugeln. Bei dieser Methode ist kein Zusatz von Calciumchlorid nötig. Außerdem haben hohe Konzentrationen an Ammoniumformiat keine destabilisierende, sondern sogar eine stabilisierende Wirkung auf die Carrageenanimobilisate. Es konnte ebenfalls eine gute Restaktivität (75 %) und ein stabiler Mehrfacheinsatz ohne Aktivitätsverlust erreicht werden. Auch nach einem Einsatz von 17 Tagen (408 Stunden) verloren die Immobilisate nicht an Aktivität und zeigten keine Verschleißspuren. Allerdings konnte festgestellt werden, dass bei der Erhöhung der Trimethylpyruvatkonzentration und der Erniedrigung der

Cofaktorkonzentration kein Vollumsatz mehr möglich ist. Nach einer Zeit von 26 Stunden und einem Umsatz von 200 mM Trimethylpyruvat kam die Aktivität zum Erliegen und konnte erst durch eine erneute Zugabe von NAD wieder gestartet werden. Es konnte festgestellt werden, dass der Cofaktor NAD/NADH durch das Vorhandensein der aktiven Ganzzellkatalysatoren zerstört wird beziehungsweise so verändert wird, dass er den Enzymen nicht mehr zur Verfügung steht. Möglicherweise werden durch die Zellen Enzyme wie Pyrophosphatasen oder Phosphodiesterasen freigesetzt, welche den Cofaktor inaktivieren. Dieses muss in weiteren Experimenten geklärt und die den Cofaktor zerstörenden Enzyme gegebenenfalls inaktiviert werden.

Insgesamt konnte auch für den Ganzzellkatalysator ein geeignetes Immobilisierungssystem gefunden werden, welches einerseits kostengünstig, einfach und leicht zu handhaben ist und das stabil gegenüber hohen Substrat- und Ionenkonzentrationen ist. Außerdem besaßen die immobilisierten Zellen eine hohe Restaktivität, welche sie auch in einem Mehrfacheinsatz von 17 Tagen nicht verloren haben.

## **6.2 Ausblick**

In zukünftigen Versuchen sollten beide Immobilisate in einem scale-up getestet werden und ihr Einsatz über einen längeren Zeitraum, mindestens mehrere Monate lang, überprüft werden. Auch die optimalen Reaktionsbedingungen, die optimale Zell- bzw. Enzymbeladung der Immobilisate und die optimale Prozessführung für die immobilisierten Enzyme und die immobilisierten Ganzzellkatalysatoren müssen noch experimentell ermittelt werden. Die dabei gewonnenen Ergebnisse können zusammen mit einer Wirtschaftlichkeitsbetrachtung die Grundlage für die Anwendung dieser Immobilisate im industriellen Maßstab bilden.

Die hier gefundenen Immobilisierungsmethoden können auch als Immobilisierungsmatrix für weitere Cofaktorregenerierungssysteme in anderen enzymkatalytischen Prozessen angewendet werden. So kann z.B. das Substratspektrum der Leucindehydrogenase bei Bedarf von Trimethylpyruvat auf andere Ketosäuren ausgeweitet werden, um entsprechend auch andere wichtige Aminosäuren herzustellen. Weiterhin können anstelle der hier immobilisierten Leucindehydrogenase andere Dehydrogenasen verwendet werden, die weitere enantiomerenreine Aminosäuren oder auch enantiomerenreine Alkohole synthetisieren können. Dazu gehören die in diesem Kooperationsprojekt in verschiedenen Screenings neu gefundenen Alkoholdehydrogenasen oder Amindehydrogenasen wie z.B. die Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* [70]. Die für den Ganzzellkatalysator entwickelte Immobilisierungsmethode kann auch auf weitere Designerzellen angewendet werden, die teilweise ebenfalls innerhalb dieses Kooperationsprojektes entwickelt wurden [100,104].

---

**LITERATUR**

- [1] Andersson,M., Holmberg,H., & Adlercreutz,P. (1998) Evaluation of *Alcaligenes eutrophus* cells as an NADH regenerating catalyst in organic-aqueous two-phase system. *Biotechnology and Bioengineering* **57**, 79-86.
- [2] Ansorge,M.B. & Kula,M.R. (2000) Investigating expression systems for the stable large-scale production of recombinant L-leucine-dehydrogenase from *Bacillus cereus* in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**, 668-673.
- [3] Bartlett,P.N., Birkin,P.R., & Wallace,E.N.K. (1997) Oxidation of beta-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at poly(aniline)-coated electrodes. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* **93**, 1951-1960.
- [4] Bastos,F.D., dos Santos,A.G., Jones,J., Oestreicher,E.G., Pinto,G.F., & Paiva,L.M.C. (1999) Three different coupled enzymatic systems for in situ regeneration of NADPH. *Biotechnology Techniques* **13**, 661-664.
- [5] Bastos,F.M., Franca,T.K., Machado,G.D.C., Pinto,G.F., Oestreicher,E.G., & Paiva,L.M.C. (2002) Kinetic modelling of coupled redox enzymatic systems for in situ regeneration of NADPH. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **19**, 459-465.
- [6] Blanchard,J.S. & Cleland,W.W. (1980) Kinetic and Chemical Mechanisms of Yeast Formate Dehydrogenase. *Biochemistry* **19**, 3543-3550.
- [7] Blandino,A., Macias,A., & Cantero,D. (2003) Calcium alginate gel as encapsulation matrix for coimmobilized enzyme systems. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **110**, 53-60.
- [8] Blandino,A., Macias,M., & Cantero,D. (2001) Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsules. *Process Biochemistry* **36**, 601-606.
- [9] Bolivar,J.M., Wilson,L., Ferrarotti,S.A., Fernandez-Lafuente,R., Guisan,J.M., & Mateo,C. (2007) Evaluation of different immobilization strategies to prepare an industrial biocatalyst of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 540-546.
- [10] Bommarius,A.S., Drauz,K., Hummel,W., Kula,M.R., & Wandrey,C. (1994) Some New Developments in Reductive Amination with Cofactor Regeneration. *Biocatalysis* **10**, 37-47.
- [11] Bommarius,A.S., Schwarm,M., & Drauz,K. (2001) Comparison of different chemoenzymatic process routes to enantiomerically pure amino acids. *Chimia* **55**, 50-59.
- [12] Bommarius,A.S., Schwarm,M., Stingl,K., Kottenhahn,M., Huthmacher,K., & Drauz,K. (1995) Synthesis and use of enantiomerically pure tert-leucine. *Tetrahedron-Asymmetry* **6**, 2851-2888.
- [13] Bornhöft,M. (2005) "kappa-Carrageenan: Ein neuer Pelletierhilfsstoff zur Feuchtexttrusion/Sphäronisation." Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- 
- [14] Bradford, M.M. (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- [15] Brunhuber, N.M.W. & Blanchard, J.S. (1994) The Biochemistry and Enzymology of Amino-Acid Dehydrogenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 415-467.
- [16] Buchholz, K. & Kasche, V. (2006) *Enzymtechnologie und immobilisierte Biokatalysatoren*, Wiley-VCH edn.
- [17] Buckmann, A.F., Morr, M., & Kula, M.R. (1987) Preparation of Technical Grade Polyethylene-Glycol (Peg) (Mr20,000)-N-6-(2-Aminoethyl)-Nadh by A Procedure Adaptable to Large-Scale Synthesis. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **9**, 258-268.
- [18] Capan, E. (2004) "Freie und immobilisierte (R)-Oxynitrilase: Charakterisierung und Herstellung von chiralen Cyanhydrinen." Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig
- [19] Chai, Y., Mei, L.H., Wu, G.L., Lin, D.Q., & Yao, S.J. (2004) Gelation conditions and transport properties of hollow calcium alginate capsules. *Biotechnology and Bioengineering* **87**, 228-233.
- [20] Chenault, H.K. & Whitesides, G.M. (1987) Regeneration of Nicotinamide Cofactors for Use in Organic-Synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **14**, 147-197.
- [21] Chibata, I., Tosa, T., Sato, T., & Takata, I. (1987) Immobilization of Cells in Carrageenan. *Methods in Enzymology* **135**, 189-198.
- [22] Czichocki, G., Dautzenberg, H., Capan, E., & Vorlop, K.D. (2001) New and effective entrapment of polyelectrolyte-enzyme-complexes in LentiKats. *Biotechnology Letters* **23**, 1303-1307.
- [23] Dautzenberg, H. (2002) Polyelectrolyte complex formation in solution. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **223**, U375.
- [24] Dautzenberg, H., Dautzenberg, H., Gensrich, H.J., Grobe, V., Hicke, H.G., & Paul, D. (1989) Precipitation Structures from Polymer-Solutions for Separation Materials. *Acta Polymerica* **40**, 177-186.
- [25] Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötz, J., Philipp, B., Seidel, Ch., & Stscherbina, D. (1994) *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Hanser Verlag, München.
- [26] Dautzenberg, H., Loth, F., Fechner, K., Mehlis, B., & Pommerening, K. (1985) Preparation and performance of symplex capsules. *Makromolekulare Chemie, Supplement 9* 203-210.
- [27] Dautzenberg, H., Loth, F., Pommerening, K., Linow, K.-J., & Bartsch, D. (1998) Mikrokapseln und Verfahren zu ihrer Herstellung. Dautzenberg, H. [DE 3308259 C2], 1-8.. Berlin, DDR.
- [28] Dautzenberg, H., Loth, F., Pommerening, K., Linow, K.-J., & Bartsch, D. (1987) Mikrokapseln und Verfahren zu ihrer Herstellung. Akademie der Wissenschaften der DDR. [CH 659591 A5], 1-5. Berlin, DDR.

- 
- [29] Dautzenberg,H., Loth,F., Pommerening,K., Linow,K.-J., & Bartesch,D. (1983) Mikrokapseln und Verfahren zu ihrer Herstellung. [160393], 1-13.
- [30] Dautzenberg,H. & Lukanoff,B. (1991) Entwicklung mikroverkapselter Systeme für biotechnische Verfahren der Stoffumwandlung und Stoffherzeugung. Ergebnisbericht des Forschungsvorhaben 0319774A. 1-48.
- [31] Dautzenberg,H., Lukanoff,B., Eckert,U., Tiersch,B., & Schuldt,U. (1996) Immobilisation of biological matter by polyelectrolyte complex formation. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **100**, 1045-1053.
- [32] Dautzenberg,H., Schuldt,U., Grasnack,G., Karle,P., Muller,P., Lohr,M., Pelegriin,M., Piechaczyk,M., Rombs,K.V., Gunzburg,W.H., Salmons,B., & Saller,R.M. (1999) Development of cellulose sulfate-based polyelectrolyte complex microcapsules for medical applications. *Bioartificial Organs II: Technology, Medicine, and Materials* **875**, 46-63.
- [33] Dautzenberg,H., Schuldt,U., Lerche,D., Woehlecke,H., & Ehwald,R. (1999) Size exclusion properties of polyelectrolyte complex microcapsules prepared from sodium cellulose sulphate and poly[diallyldimethylammonium chloride]. *Journal of Membrane Science* **162**, 165-171.
- [34] DECHEMA e.V. (2005) weiße Biotechnologie. "www.weiße-biotechnologie.de" Internet Communication
- [35] Dickenson,C.J. & Dickinson,F.M. (1975) Study of Ph-Dependence and Temperature-Dependence of Reactions of Yeast Alcohol-Dehydrogenase with Ethanol, Acetaldehyde and Butyraldehyde As Substrates. *Biochemical Journal* **147**, 303-311.
- [36] Eckstein,M., Daussmann,T., & Kragl,U. (2004) Recent developments in NAD(P)H regeneration for enzymatic reductions in one- and two-phase systems. *Biocatalysis and Biotransformation* **22**, 89-96.
- [37] Ernst,M., Kaup,B., Muller,M., Bringer-Meyer,S., & Sahm,H. (2005) Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**, 629-634.
- [38] Forster,M., Mansfeld,J., Dautzenberg,H., & Schellenberger,A. (1996) Immobilization in polyelectrolyte complex capsules: Encapsulation of a gluconate-oxidizing *Serratia marcescens* strain. *Enzyme and Microbial Technology* **19**, 572-577.
- [39] Forster,M., Mansfield,J., Schellenberger,A., & Dautzenberg,H. (1994) Immobilization of Citrate-Producing *Yarrowia-Lipolytica* Cells in Polyelectrolyte Complex Capsules. *Enzyme and Microbial Technology* **16**, 777-784.
- [40] Fusetani,N. & Matsunaga,S. (1993) Bioactive Sponge Peptides. *Chemical Reviews* **93**, 1793-1806.
- [41] Galkin,A., Kulakova,L., Yoshimura,T., Soda,K., & Esaki,N. (1997) Synthesis of optically active amino acids from alpha-keto acids with *Escherichia coli* cells expressing heterologous genes. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4651-4656.
- [42] Goosen,M.F.A., O Shea,G.M., Gharapetian,H.M., Chou,S., & Sun,A.M. (1985) Optimization of Microencapsulation Parameters - Semipermeable Microcapsules As A Bioartificial Pancreas. *Biotechnology and Bioengineering* **27**, 146-150.

- 
- [43] Gorton, L. (2002) Electrochemistry of NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H. In *Encyclopedia of Electrochemistry* (Bard AJ & Stratmann, M., eds), pp. 67-143. Weinheim.
- [44] Gotze, M., Torner, H., Kauffold, P., König, I., Dautzenberg, H., & Loth, F. (1986) Examination of the Release of Immobilized Substances from Symplex Capsules. *Pharmazie* **41**, 250-253.
- [45] Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., & Thom, D. (1973) Biological Interactions Between Polysaccharides and Divalent Cations - Egg-Box Model. *Febs Letters* **32**, 195-198.
- [46] Groger, H., Chamouleau, F., Orolagos, N., Rollmann, C., Drauz, K., Hummel, W., Weckbecker, A., & May, O. (2006) Enantioselective reduction of ketones with "Designer cells" at high substrate concentrations: Highly efficient access to functionalized optically active alcohols". *Angewandte Chemie-International Edition* **45**, 5677-5681.
- [47] Groger, H., Hummel, W., Buchholz, S., Drauz, K., Van Nguyen, T., Rollmann, C., Husken, H., & Abokitse, K. (2003) Practical asymmetric enzymatic reduction through discovery of a dehydrogenase-compatible biphasic reaction media. *Organic Letters* **5**, 173-176.
- [49] Groger, H., Hummel, W., Rollmann, C., Chamouleau, F., Husken, H., Werner, H., Wunderlich, C., Abokitse, K., Drauz, K., & Buchholz, S. (2004) Preparative asymmetric reduction of ketones in a biphasic medium with an (S)-alcohol dehydrogenase under in situ-cofactor-recycling with a formate dehydrogenase. *Tetrahedron* **60**, 633-640.
- [49] Grootwassink, T., Dautzenberg, H., Grunow, R., & Vonbaehr, R. (1992) Microencapsulation of Hybridomas by Cellulose Sulfate-Polydimethyldiallylammonium Chloride Procedure. *Acta Biotechnologica* **12**, 169-178.
- [50] Guiseley, K.B. (1989) Chemical and Physical-Properties of Algal Polysaccharides Used for Cell Immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* **11**, 706-717.
- [51] Hainke, M., Ammon, K., & Onken, U. (1998) Simultaneous measurement of dissolved oxygen concentration and hydrodynamics in aerobic submerged fermentations. *Chemie Ingenieur Technik* **70**, 299-301.
- [52] Hartmeier, W. (1996) *Immobilisierte Biokatalysatoren*. Springer Verlag, Heidelberg.
- [53] Hollmann, F. & Schmid, A. (2004) Electrochemical regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions. *Biocatalysis and Biotransformation* **22**, 63-88.
- [54] Hübner, H. (1998) "Immobilisierung von Insektenzellen zur Optimierung der Produktbildung und -gewinnung." Dissertation, Technische Universität Berlin
- [55] Hummel, W. (1999) Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends in Biotechnology* **17**, 487-492.
- [56] Hummel, W. & Kula, M.R. (1989) Dehydrogenases for the Synthesis of Chiral Compounds. *European Journal of Biochemistry* **184**, 1-13.
- [57] Hummel, W. & Riebel, B. (1996) Chiral alcohols by enantioselective enzymatic oxidation. *Enzyme Engineering Xiii* **799**, 713-716.
- [58] Ikemi, M., Ishimatsu, Y., & Kise, S. (1990) Sorbitol Production in Charged Membrane Bioreactor with Coenzyme Regeneration System .2. Theoretical-Analysis of A



- Continuous Reaction with Retained and Regenerated Nadph. *Biotechnology and Bioengineering* **36**, 155-165.
- [59] Jahnz,U. (2001) "Screening-Automation auf Basis hohlkugelverkapselter Zellen und enzymatische Bildung von Difructoseanhydrid III aus Inulin unter thermophilen Bedingungen (Screening, Charakterisierung, Immobilisierung)." Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig.
- [60] Jekel,M., Buhr,A., Willke,T., & Vorlop,K.D. (1998) Immobilization of biocatalysts in LentiKats. *Chemical Engineering & Technology* **21**, 275-+.
- [61] Julliard,M. & Lepetit,J. (1982) Regeneration of NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> Cofactors by Photosensitized Electron-Transfer. *Photochemistry and Photobiology* **36**, 283-290.
- [62] Kabanov,V.A. (1992) Interpolyelectrolyte Gels - Properties, Structure, Perspectives. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **203**, 5-MSE.
- [63] Kajiwara,S. & Maeda,H. (1987) The Improvement of A Droplet Gel-Entrapping Method - the Coimmobilization of Leucine Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase. *Agricultural and Biological Chemistry* **51**, 2873-2879.
- [64] Kataoka,K. & Tanizawa,K. (2003) Alteration of substrate specificity of leucine dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **23**, 299-309.
- [66] Kataoka,M., Rohani,L.P.S., Yamamoto,K., Wada,M., Kawabata,H., Kita,K., Yanase,H., & Shimizu,S. (1997) Enzymatic production of ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate: asymmetric reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by an *Escherichia coli* transformant expressing the aldehyde reductase gene from yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **48**, 699-703.
- [66] Kato,N., Sahm,H., & Wagner,F. (1979) Steady-State Kinetics of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from A Methanol-Utilizing Yeast, *Candida-Boidinii*. *Biochimica et Biophysica Acta* **566**, 12-20.
- [67] Kaup,B., Bringer-Meyer,S., & Sahm,H. (2004) Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**, 333-339.
- [68] Kaup,B., Bringer-Meyer,S., & Sahm,H. (2005) D-mannitol formation from D-glucose in a whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 397-403.
- [69] Kiba,N., Oyama,Y., Kato,A., & Furusawa,M. (1996) Postcolumn co-immobilized leucine dehydrogenase-NADH oxidase reactor for the determination of branched-chain amino acids by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A* **724**, 354-357.
- [70] Kirschbaum,M. (1999) "Neue asymmetrische Aminosäuresynthesen auf Basis von Menthon als chiraalem Auxiliar." Dissertation, Bergischen Universität Gesamthochschule Wuppertal
- [71] Klein,J. & Vorlop,K.-D. (1985) Immobilization techniques. In *Cells in comprehensive biotechnology* (Moo-Young,M., ed), pp. 203-224. Pergamon Press, Oxford.

- 
- [72] Kragl,U., Kruse,W., Hummel,W., & Wandrey,C. (1996) Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example. *Biotechnology and Bioengineering* **52**, 309-319.
- [73] Kragl,U., VasicRacki,D., & Wandrey,C. (1996) Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors - Modelling and computer simulation. *Bioprocess Engineering* **14**, 291-297.
- [74] Kragl,U., VasicRacki,D., & Wandrey,C. (1996) Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors - Modelling and computer simulation. *Bioprocess Engineering* **14**, 291-297.
- [75] Kragl,U., VasicRacki,D., & Wandrey,C. (1992) Continuous-Processes with Soluble Enzymes. *Chemie Ingenieur Technik* **64**, 499-509.
- [76] Krieg,L. (2002) "Screening und Charakterisierung neuer Aminosäure-Amidasen zur Racematspaltung Klonierung und Expression einer D-Amidase aus *Variovorax paradoxus* in *E. coli*." Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [77] Krix,G. (1995) "Enzymatische Synthese von nichtproteinogenen, hydrophoben L--Aminosäuren [L-alpha-Aminosäuren] und von Dipeptiden." Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [78] Krix,G., Bommarius,A.S., Drauz,K., Kottenhahn,M., Schwarm,M., & Kula,M.R. (1997) Enzymatic reduction of alpha-keto acids leading to L-amino acids, D- or L-hydroxy acids. *Journal of Biotechnology* **53**, 29-39.
- [79] Kruse,W., Hummel,W., & Kragl,U. (1996) Alcohol-dehydrogenase-catalyzed production of chiral hydrophobic alcohols. A new approach leading to a nearly waste-free process. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* **115**, 239-&.
- [80] Kula,M.R. & Wandrey,C. (1987) Continuous Enzymatic Transformation in An Enzyme-Membrane Reactor with Simultaneous Nadh Regeneration. *Methods in Enzymology* **136**, 9-21.
- [81] Kula,M.-R. & Kragl,U. (2000) Dehydrogenases in synthesis of chiral compounds. In *Stereoselective Biocatalysis* (R.Patel, ed), pp. 839-866. Marcel Dekker, New York.
- [82] Kula,M.-R., Pohl,M., & Slusarczyk,H. (2001) Mutants of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, new gene sequences encoding these and use of the new formate dehydrogenases. Degussa Aktiengesellschaft. 203893[6242234], 1-12.. Frankfurt DE
- [83] Labrou,N.E. (2000) Improved purification of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Bioseparation* **9**, 99-104.
- [84] Labrou,N.E. & Rigden,D.J. (2001) Active-site characterization of *Candida boidinii* formate dehydrogenase. *Biochemical Journal* **354**, 455-463.
- [85] Lamed,R.J. & Zeikus,J.G. (1981) Novel NADp-Linked Alcohol-Aldehyde-Ketone Oxidoreductase in Thermophilic Ethanogenic Bacteria. *Biochemical Journal* **195**, 183-190.
- [86] Lamzin,V.S., Dauter,Z., Popov,V.O., Harutyunyan,E.H., & Wilson,K.S. (1994) High Resolution Structures of Holo and Apo Formate Dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology* **236**, 759-785.

- 
- [87] Liese, A., Zelinski, T., Kula, M.R., Kierkels, H., Karutz, M., Kragl, U., & Wandrey, C. (1998) A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **4**, 91-99.
- [90] Lim, F. (1979) Encapsulation of chemically active, biologically active materials and viable tissues. 8008971[GB 2046209 A], 1-10.. United States of America.
- [89] Lim, F. (1984) Microencapsulation of Living Cells and Tissues - 1983 Review and Update. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **10**, 81-85.
- [90] Lim, F. & Moss, R.D. (1981) Microencapsulation of Living Cells and Tissues. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **70**, 351-354.
- [91] Lim, F. & Sun, A.M. (1980) Microencapsulated Islets As Bioartificial Endocrine Pancreas. *Science* **210**, 908-910.
- [92] Lim, F. & Sun, A.M. (1981) Microencapsulated Islets in Diabetic Rats. *Science* **213**, 1146.
- [93] Lin, S.S., Harada, T., Hata, C., Miyawaki, O., & Nakamura, K. (1997) Nanofiltration membrane bioreactor for continuous asymmetric reduction of 2-ketoglutarate to produce L-glutamate with NADH regeneration. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **83**, 54-58.
- [94] Lortie, R., Villaume, I., Legoy, M.D., & Thomas, D. (1989) Enzymatic Production of Long-Chain Aldehydes in A Fixed-Bed Reactor Using Organic-Solvents and Cofactor Regeneration. *Biotechnology and Bioengineering* **33**, 229-232.
- [95] Lukanoff, B. & Dautzenberg, H. (1994) Sodium Cellulose Sulfate As A Component in the Creation of Microcapsules Through Forming Polyelectrolyte Complexes .1. Heterogeneous Sulfation of Cellulose by the Use of Sulfuric-Acid Propanol As Reaction Medium and Sulfating Agent. *Papier* **48**, 287-&.
- [96] Lunsdorf, H. & Tsai, H. (1985) Quaternary Organization of Subunits in the L-Leucine Dehydrogenase from *Bacillus-Cereus*. *Febs Letters* **193**, 261-266.
- [97] Lutz, J., Mozhaev, V.V., Khmel'nitsky, Y.L., Witholt, B., & Schmid, A. (2002) Preparative application of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase with enzymatic cofactor regeneration in organic-aqueous reaction media. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **19**, 177-187.
- [98] Mansfeld, J., Forster, M., Schellenberger, A., & Dautzenberg, H. (1991) Immobilization of Invertase by Encapsulation in Polyelectrolyte Complexes. *Enzyme and Microbial Technology* **13**, 240-244.
- [99] Marburger, A. (2003) "Alginate und Carrageenane – Eigenschaften, Gewinnung und Anwendungen in Schule und Hochschule." Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- [100] May, O.; Gröger, H. (2005) Hocheffizient und kostengünstig: Designerzellen produzieren enantiomerenreine Verbindungen. *elements, Degussa Science Newsletter* **12**, 20-24. Degussa AG.
- [101] Melvik, J.E., Dornish, M. (2004) Alginate as a carrier for cell immobilisation. In: Fundamentals of cell immobilisation biotechnology (Nedovik, V.; Willaert, P., eds), pp. 33-51. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (NL).

- 
- [102] Menzel,A. (2006) "Gentechnisch veränderte *Escherichia coli*-Zellen zur biokatalytischen Herstellung enantiomerenreiner Aminosäuren und sekundärer Alkohole. Dissertation, Universität Stuttgart
- [103] Menzel,A., Werner,H., Altenbuchner,J., & Groger,H. (2004) From enzymes to "designer bugs" in reductive amination: A new process for the synthesis of L-tert-leucine using a whole cell-catalyst. *Engineering in Life Sciences* **4**, 573-576.
- [104] Merten,O.W., Dautzenberg,H., & Palfi,G.E. (1991) A New Method for the Encapsulation of Mammalian-Cells. *Cytotechnology* **7**, 121-130.
- [105] Mertens,R., Greiner,L., van den Ban,E.C.D., Haaker,H.B.C.M., & Liese,A. (2003) Practical applications of hydrogenase I from *Pyrococcus furiosus* for NADPH generation and regeneration. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **24-5**, 39-52.
- [106] Michaels,A.S., Mir,L., & Schneide,N.S. (1965) A Conductometric Study of Polycation-Polyanion Reactions in Dilute Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry* **69**, 1447-&.
- [107] Morris,E.R. (1986) Molecular-Interactions in Polysaccharide Gelation. *British Polymer Journal* **18**, 14-21.
- [108] Mosbach,K. & Mosbach,R. (1966) Entrapment of Enzymes and Microorganisms in Synthetic Cross-Linked Polymers and Their Application in Column Techniques. *Acta Chemica Scandinavica* **20**, 2807-&.
- [109] Nakamura,K., Aizawa,M., & Miyawaki,O. (1988) *Electro-enzymology / Coenzyme Regeneration*, Springer-Verlag GmbH edn.
- [110] Nakamura,K. & Yamanaka,R. (2002) Light-mediated regulation of asymmetric reduction of ketones by a cyanobacterium. *Tetrahedron-Asymmetry* **13**, 2529-2533.
- [111] Nigam,S.C., Tsao,I.-F., Sakoda,A., & Wang,H.Y. (1988) Techniques for preparing hydrogel membrane capsules. *Biotechnology Techniques* **2**, 271-276.
- [112] Ohkawa,K., Kitagawa,T., & Yamamoto,H. (2004) Preparation and characterization of chitosan-gellan hybrid capsules formed by self-assembly at an aqueous solution interface. *Macromolecular Materials and Engineering* **289**, 33-40.
- [113] Ohshima,T., Misono,H., & Soda,K. (1978) Properties of Crystalline Leucine Dehydrogenase from *Bacillus-Sphaericus*. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 5719-5725.
- [113] Ohshima,T., Misono,H., & Soda,K. (1978) Properties of Crystalline Leucine Dehydrogenase from *Bacillus-Sphaericus*. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 5719-5725.
- [114] Okamoto,Y., Kaku,T., & Shundo,R. (1996) Design and application of novel functional dyes containing polymers for biosensors and organic syntheses. *Pure and Applied Chemistry* **68**, 1417-1421.
- [115] Onsøyen,E. (1997) Alginates. In *Thickening and Gelling Agents for the Food Industry* (Imeson,A., ed), pp. 22-44. Chapman & Hall, London.

- 
- [116] Orlich,B. (2000) "Biokatalyse an hydrophoben Substraten mit Tensiden und Membranen als reaktionstechnische Werkzeuge." Dissertation, Technische Universität Berlin
- [117] Orlich,B., Berger,H., Lade,M., & Schomacker,R. (2000) Stability and activity of alcohol dehydrogenases in W/O-microemulsions: Enantioselective reduction including cofactor regeneration. *Biotechnology and Bioengineering* **70**, 638-646.
- [118] Pariente,F., Tobalina,F., Moreno,G., Hernandez,L., Lorenzo,E., & Abruna,H.D. (1997) Mechanistic studies of the electrocatalytic oxidation of NADH and ascorbate at glassy carbon electrodes modified with electrodeposited films derived from 3,4-dihydroxybenzaldehyde. *Analytical Chemistry* **69**, 4065-4075.
- [119] Park,U.E., Olivera,B.M., Hughes,K.T., Roth,J.R., & Hillyard,D.R. (1989) DNA-Ligase and the Pyridine-Nucleotide Cycle in Salmonella-Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **171**, 2173-2180.
- [120] Pasta,P., Carrea,G., Gaggero,N., Grogan,G., & Willetts,A. (1996) Enantioselective oxidations catalyzed by diketocamphane monooxygenase from Pseudomonas putida with macromolecular NAD in a membrane reactor. *Biotechnology Letters* **18**, 1123-1128.
- [121] Patel,A. (1998) "Verkapselungsverfahren für die biologische Schädlingsbekämpfung und zur Konstruktion von „vegetativen" Samen." Dissertation Technische Universität Carolo Wilhelmina Braunschweig
- [122] Penfound,T. & Foster,J.W. (1996) Biosynthesis and Recycling of NAD. In *Escherichia coli and Salmonella:Cellular and molecular biology* (Neidhardt,F.C.e.a., ed), pp. 721-729. ASM Press, Washington DC.
- [123] Peter Karlson, Detlef Doenecke, & Jan Koolman (2005) *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Thieme, Stuttgart.
- [124] Peters,J. & Kula,M.R. (1991) Continuous Production of NADPH with Thermostable Secondary Alcohol-Dehydrogenase in An Enzyme Membrane Reactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **13**, 363-370.
- [125] Pfruender,H., Amidjojo,M., Kragl,U., & Weuster-Botz,D. (2004) Efficient whole-cell biotransformation in a biphasic ionic liquid/water system. *Angewandte Chemie-International Edition* **43**, 4529-4531.
- [126] Philipp,B., Dawydoff,W., & Linow,K.J. (1982) Poly-Electrolyte Complexes. *Zeitschrift für Chemie* **22**, 1-13.
- [127] Pohl,M. (2001) Optimization of biocatalysts for technical processes. *Chemical Engineering & Technology* **24**, 17-20.
- [128] Pommerening,K., Ristau,O., Rein,H., Dautzenberg,H., & Loth,F. (1983) Immobilization of Proteins and Cell Fragments by Use of A New Method of Microencapsulation. *Biomedica Biochimica Acta* **42**, 813-823.
- [129] Pommersheim,R., Löwe,H., Rilling,P., Berger,S., & Vogt,W. (1998) Kleine Kapseln, große Wirkung. *Pharma+Food* **1**, 24-26.
- [130] Prüße,U. (1999) "Entwicklung, Charakterisierung und Einsatz von Edelmetallkatalysatoren zur Nitratreduktion mit Wasserstoff und Ameisensäure sowie des Strahlschneider-Verfahrens zur Herstellung Polyvinylalkohol-verkapselter

- Katalysatoren." Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig
- [131] Rees,D.A. & Welsh,E.J. (1977) Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels. *Angewandte Chemie-International Edition* **16**, 214-223.
- [132] Relyea,H.A. & van der Donk,W.A. (2005) Mechanism and applications of phosphite dehydrogenase. *Bioorganic Chemistry* **33**, 171-189.
- [133] Rissom,S., Beliczey,J., Giffels,G., Kragl,U., & Wandrey,C. (1999) Asymmetric reduction of acetophenone in membrane reactors: comparison of oxazaborolidine and alcohol dehydrogenase catalysed processes. *Tetrahedron-Asymmetry* **10**, 923-928.
- [134] Rissom,S., SchwarzLinek,U., Vogel,M., Tishkov,V.I., & Kragl,U. (1997) Synthesis of chiral epsilon-lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with integrated bubble-free aeration. *Tetrahedron-Asymmetry* **8**, 2523-2526.
- [135] Rodionov,Y.V. & Zakharova,E.V. (1980) 2 Pathways of Formate Oxidation in Methylophilic Bacteria. *Biochemistry-Moscow* **45**, 654-661.
- [136] Rose,T. (2001) "Fermentation und Verkapselung des nematophagen Pilzes *Hirsutella rhossiliensis* in Polyelektrolyt-Hohlkugeln zur biologischen Bekämpfung des Nematoden *Heterodera schachtii*." Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig
- [137] Russell,A.J. & Yang,F.X. (1996) Catalyze gas-phase reactions with enzymes. *Chemtech* **26**, 24-27.
- [138] Sakai,Y., Murdanoto,A.P., Konishi,T., Iwamatsu,A., & Kato,N. (1997) Regulation of the formate dehydrogenase gene, FDH1, in the methylophilic yeast *Candida boidinii* and growth characteristics of an FDH1-disrupted strain on methanol, methylamine, and choline. *Journal of Bacteriology* **179**, 4480-4485.
- [139] Sanwal,B.D. & Zink,M.W. (1961) L-Leucine Dehydrogenase of *Bacillus Cereus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **94**, 430-&.
- [140] Schipper,D. (1983) The Revised Structure of Botromycin-A2. *Journal of Antibiotics* **36**, 1076-1077.
- [141] Schirwitz,K., Schmidt,A., & Lamzin,V.S. (2007) High-resolution structures of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Protein Science* **16**, 1146-1156.
- [142] Schmid,A., Dordick,J.S., Hauer,B., Kiener,A., Wubbolts,M., & Witholt,B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**, 258-268.
- [143] Schmid,A., Vereyken,I., Held,M., & Witholt,B. (2001) Preparative regio- and chemoselective functionalization of hydrocarbons catalyzed by cell free preparations of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **11**, 455-462.
- [144] Schneider,T. (2004) "Gerichtete Evolution als Methode zur Erzeugung enantioselektiver Cyclohexanonmonooxygenasen (CHMOs) für die Katalyse von Baeyer-Villiger-Reaktionen." Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

- 
- [145] Schutte,H., Flossdorf,J., Sahm,H., & Kula,M.R. (1976) Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase from *Candida-Boidinii*. *European Journal of Biochemistry* **62**, 151-160.
- [146] Schutte,H., Hummel,W., Tsai,H., & Kula,M.R. (1985) L-Leucine Dehydrogenase from *Bacillus-Cereus* - Production, Large-Scale Purification and Protein Characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology* **22**, 306-317.
- [147] Sekimoto,T., Matsuyama,T., Fukui,T., & Tanizawa,K. (1993) Evidence for Lysine-80 As General Base Catalyst of Leucine Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 27039-27045.
- [148] Slusarczyk,H., Felber,S., Kula,M.R., & Pohl,M. (2000) Stabilization of NAD-dependent formate dehydrogenase from *Candida boidinii* by site-directed mutagenesis of cysteine residues. *European Journal of Biochemistry* **267**, 1280-1289.
- [149] Smidsrød,O. & Skjåk-Bræk,G. (1990) Alginate as Immobilisation Matrix for Cells. *TIBTECH* **8**, 71-78.
- [150] Spiekermann,P., Vorlop,K.D., & Klein,J. (1987) Animal Cells encapsulated within Ca-Alginate Hollow-Spheres. In Proceedings of the 4th European Congress on Biotechnology (Neijssel,O.M., van der Meer,R.R., & Loyben,K.Ch.A.M., eds), pp. 590-593. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- [151] Stange,J., Mitzner,S., Dautzenberg,H., Ramlow,W., Knippel,M., Steiner,M., Ernst,B., Schmidt,R., & Klinkmann,H. (1993) Prolonged Biochemical and Morphological Stability of Encapsulated Liver-Cells - A New Method. *Biomaterials Artificial Cells and Immobilization Biotechnology* **21**, 343-352.
- [152] Stefan Felber (2001) "Optimierung der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* für den Einsatz in der Biokatalyse." Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [153] Stefuca,V., Gemeiner,P., Kurillova,L., Dautzenberg,H., Polakovic,M., & Bales,V. (1991) Polyelectrolyte Complex Capsules As A Material for Enzyme Immobilization - Catalytic Properties of Encapsulated Lactate-Dehydrogenase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **30**, 313-324.
- [154] Stengelin,M. & Patel,R.N. (2000) Phenylalanine dehydrogenase catalyzed reductive amination of 6-(1',3'-dioxolan-2'-yl)-2-keto-hexanoic acid to 6-(1',3'-dioxolan-2'-yl)-2S-aminohexanoic acid with NADH regeneration and enzyme and cofactor retention. *Biocatalysis and Biotransformation* **18**, 373-400.
- [155] Tafertshofer,G. & Talsky,G. (1989) Intra -und intermolecular crosslinking of enzymes by dianhydrides and N-hydroxysuccinimide esters. *DECHEMA Biotechnology Conferences* **3**, 171-174.
- [156] Talsky,G. & Tafertshofer,G. (1990) Influence of intra -und intermolecular crosslinking on Activity, Stability and Kinetics of enzymes. *DECHEMA Biotechnology Conferences* **4**, 135-138.
- [157] Tamaki,N., Nakamura,M., Kimura,K., & Hama,T. (1977) Purification and Properties of Aldehyde Dehydrogenase from *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Journal of Biochemistry* **82**, 73-79.
- [158] Theorell,H. & Mckinleymckee,J.S. (1961) Liver Alcohol Dehydrogenase .1. Kinetics and Equilibria Without Inhibitors. *Acta Chemica Scandinavica* **15**, 1797-&.

- 
- [159] Thomas, S.M., DiCosimo, R., & Nagarajan, A. (2002) Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends in Biotechnology* **20**, 238-242.
- [160] Tishkov, V.I. & Popov, V.O. (2004) Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry-Moscow* **69**, 1252-+.
- [161] Tsuchida, E., Osada, Y., & Sanada, K. (1972) Interaction of Poly(Styrene Sulfonate) with Polycations Carrying Charges in Chain Backbone. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **10**, 3397-3404.
- [162] Ulrich, F., Tullius S.G., & Gärtner M. (2001) Mikroenkapsulierung von humanem Nebenschilddrüsengewebe mit Natriumcellulosesulfat und Poly-DADMAC. *Acta Chir. Austriaca* **33**, 15.
- [163] Virto, C., Svensson, I., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1995) Catalytic Activity of Noncovalent Complexes of Horse Liver Alcohol-Dehydrogenase, Nad<sup>+</sup> and Polymers, Dissolved Or Suspended in Organic-Solvents. *Biotechnology Letters* **17**, 877-882.
- [164] Vorlop, K.-D. (1984) "Entwicklung von Verfahren zur Polymerfixierung von Mikroorganismen und Anwendung der Biokatalysatoren zur Spaltung von Penicillin G und Synthese von L-Tryptophan." Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig.
- [165] Vorlop, K.-D. & Klein, J. (1983) New developments in the field of cell immobilization-Formation of biocatalysts by ionotropic gelation. In *Enzyme Technology* (Lafferty, R.M., ed), pp. 221-235. Springer-Verlag, Heidelberg.
- [166] Wandrey, C. (2004) Biochemical reaction engineering for redox reactions. *Chemical Record* **4**, 254-265.
- [167] Wang, H.N. & Gunsalus, R.P. (2003) Coordinate regulation of the Escherichia coli formate dehydrogenase fdnGHI and fdhF genes in response to nitrate, nitrite, and formate: Roles for NarL and NarP. *Journal of Bacteriology* **185**, 5076-5085.
- [168] Weckbecker, A. & Hummel, W. (2004) Improved synthesis of chiral alcohols with Escherichia coli cells co-expressing pyridine nucleotide transhydrogenase, NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenase and NAD(+)-dependent formate dehydrogenase. *Biotechnology Letters* **26**, 1739-1744.
- [169] Wichmann, R. & Vasic-Racki, D. (2005) Cofactor regeneration at the lab scale. *Technology Transfer in Biotechnology: from Lab to Industry to Production* **92**, 225-260.
- [170] Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann, A.F., & Kula, M.R. (2000) Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration (Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, vol 23, pg 2789-2802, 1981). *Biotechnology and Bioengineering* **67**, 791-804.
- [171] Wichmann, R., Wandrey, C., & Grosse-wiesmann, J. (1990) Continuous Microbial-Production of L-Leucine with Cell Retention. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**, 373-379.
- [172] Wilke, A. (2001) "Optimierung der biosorptiven Schwermetallentfernung unter Verwendung von immobilisierter Algenbiomasse." Dissertation, Technische Universität Berlin



- 
- [173] Wittlich, P. (2001) "Biotechnische Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glycerin mit immobilisierten Zellen von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 und thermophilen Mikroorganismen." Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig.
- [174] Wohlgemuth, R. (2007) Interfacing biocatalysis and organic synthesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82**, 1055-1062.
- [175] Woltinger, J., Drauz, K., & Bommarius, A.S. (2001) The membrane reactor in the fine chemicals industry. *Applied Catalysis A-General* **221**, 171-185.
- [176] Wong, C.H., Gordon, J., Cooney, C.L., & Whitesides, G.M. (1981) Regeneration of Nad(P)H Using Glucose 6-Sulfate and Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase. *Journal of Organic Chemistry* **46**, 4676-4679.
- [177] Yoshioka, T., Hirano, R., Shioya, T., & Kako, M. (1990) Encapsulation of Mammalian-Cell with Chitosan Cmc Capsule. *Biotechnology and Bioengineering* **35**, 66-72.
- [178] Zaitsev, S.Y., Gorokhova, I.V., Kashtigo, T.V., Zintchenko, A., & Dautzenberg, H. (2003) General approach for lipases immobilization in polyelectrolyte complexes. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects* **221**, 209-220.
- [179] Zambianchi, F., Pasta, P., Carrea, G., Colonna, S., Gaggero, N., & Woodley, J.M. (2002) Use of isolated cyclohexanone monooxygenase from recombinant *Escherichia coli* as a biocatalyst for Baeyer-Villiger and sulfide oxidations. *Biotechnology and Bioengineering* **78**, 489-496.
- [180] Zink, M.W. & Sanwal, B.D. (1962) Distribution and Substrate Specificity of L-Leucine Dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **99**, 72-&.

## 7 ABKÜRZUNGEN

### 7.1 *Abkürzungen*

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| BFM                             | Biofeuchtmasse                             |
| bzw.                            | beziehungsweise                            |
| ca.                             | circa                                      |
| Ca <sup>2+</sup>                | Calciumion                                 |
| CaCl <sub>2</sub>               | Calciumchlorid                             |
| CO <sub>2</sub>                 | Kohlendioxid                               |
| CS                              | Cellulosesulfat                            |
| d                               | Durchmesser                                |
| d. h.                           | das heißt                                  |
| E.C.                            | Enzyme Commission                          |
| EA                              | Enzymaktivität                             |
| EMR                             | Enzym-Membran-Reaktor                      |
| et al.                          | und andere                                 |
| etc.                            | et cetera (und so weiter)                  |
| EtOH                            | Ethanol                                    |
| Fa.                             | Firma                                      |
| FAL                             | Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft |
| FDH                             | Formiatdehydrogenase                       |
| GC                              | Gaschromatographie                         |
| GDA                             | Glutardialdehyd                            |
| H <sub>2</sub> O                | Wasser                                     |
| HCl                             | Salzsäure                                  |
| HPLC                            | Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie |
| i. a.                           | im allgemeinen                             |
| k. A.                           | keine Angabe(n)                            |
| K <sup>+</sup>                  | Kaliumion                                  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Di-Kaliumhydrogenphosphat                  |
| KCl                             | Kaliumchlorid                              |

---

|   |  |
|---|--|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                              | Kalium-Di-Hydrogenphosphat                         |
| $K_i$   | Inhibierungskonstante                              |
| $K_m$   | Michaelis-Menten-Konstante                         |
| KPi   | Kaliumphosphatpuffer                               |
| LB-Medium   | Luria-Bertani-Medium                               |
| LeuDH   | Leucindehydrogenase                                |
| Lsg.  | Lösung   |
| L- <i>tert</i> -Leucin                                | L-Tertiärleucin                                    |
| Lys68   | Lysinrest an Stelle 68                             |
| max.  | maximal  |
| $\text{Mg}^{2+}$                                      | Magnesiumion                                       |
| $\text{MgCl}_2$                                       | Magnesiumchlorid                                   |
| Mio   | Million  |
| MOPSO   | 3-Morpholino-2-hydroxypropansulfonsäure            |
| n.a.  | nicht ausgewertet                                  |
| n.n.  | nicht nachweisbar                                  |
| $\text{Na}^+$   | Natriumion   |
| NaCl  | Natriumchlorid                                     |
| NAD, $\text{NAD}^+$                                   | Nicotinamid-Dinukleotid, oxidiert                  |
| NADH, $\text{NADH}_2$                                 | Nicotinamid-Dinukleotid, reduziert                 |
| $\text{NADP}$ , $\text{NADP}^+$                       | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, oxidiert  |
| $\text{NADPH}$ , $\text{NADPH}_2$                     | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduziert |
| NaOH  | Natronlauge  |
| $\text{NH}_2$ -                                       | Amino-   |
| $\text{NH}_4^+$                                       | Ammonium   |
| $\text{NH}_4\text{For}$ / $\text{NH}_4\text{Formiat}$ | Ammoniumformiat                                    |
| Nr.   | Nummer   |
| OD  | Optische Dichte                                    |
| PDADMAC   | Polydiallyldimethylammioniumchlorid                |
| PEG   | Polyethylenglycol                                  |

|        |  |
|--------|--|
| PEI    | Polyethylenimin  |
| pH     | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration |
| PVAL   | Polyvinylalkohol   |
| RestEA | Restenzymaktivität, Restaktivität [%]                                |
| RI     | Refraktionsindex   |
| RT     | Raumtemperatur   |
| s.     | siehe  |
| TMP    | Trimethylpyruvat   |
| TRIZMA | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propandiol                             |
| TU     | Technische Universität   |
| U      | Units, Enzymeinheiten  |
| UV     | ultraviolett   |
| UV/VIS | ultravioletter und sichtbarer Bereich                                |
| vgl.   | vergleiche   |
| z. B.  | zum Beispiel   |

## **7.2 Formelzeichen und Symbole**

|                 |                            |
|-----------------|----------------------------|
| %               | Prozent                    |
| % (w/w)         | Gewichtsprozent            |
| $\kappa$        | Kappa                      |
| $\iota$         | Iota                       |
| $\gamma$        | Lambda                     |
| (k)Da           | (Kilo)Dalton               |
| $\varnothing$   | Durchmesser                |
| ®               | eingetragenes Warenzeichen |
| °C              | Celsius                    |
| $\mu\text{M}$   | Mikromolar                 |
| $\mu\text{mol}$ | Mikromol                   |
| c               | Konzentration [mol/L]      |
| cm              | Centimeter                 |
| g               | Gramm                      |

---

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| h  | Höhe                              |
| h  | Stunde (hour)                     |
| kg   | Kilogramm                         |
| l  | Liter                             |
| M  | Molekulargewicht (g/mol)          |
| m  | Masse                             |
| m  | Meter                             |
| M  | Molar (mol/l)                     |
| mg   | Milligramm                        |
| mg <sub>Flock</sub> /mg <sub>Protein</sub> | mg Flockungsmittel pro mg Protein |
| min  | Minute                            |
| ml   | Milliliter                        |
| mm   | Millimeter                        |
| mM   | Millimolar                        |
| mmol                                       | Millimol                          |
| mol  | Mol (Stoffmenge)                  |
| mPas                                       | Millipascal                       |
| nm   | Nanometer                         |
| rpm  | Umdrehungen pro Minute            |
| s  | Sekunde(n)                        |
| T  | Temperatur                        |
| U/min                                      | Umdrehungen pro Minute            |
| v  | Reaktionsgeschwindigkeit          |
| V  | Volumen                           |
| V <sub>gesamt</sub>                        | Gesamtvolumen                     |
| α  | Alpha                             |
| β  | Beta                              |
| μl   | Mikroliter                        |
| μm   | Mikrometer                        |

## 8 VERWENDETE GERÄTE UND CHEMIKALIEN

### 8.1 Verwendete Geräte

| Gerät   | Typ                                     | Firma                                      |
|---|---|--|
| Analysenwaage   | Sartorius Analytic A 200                | Sartorius, Göttingen                       |
| Autoklav groß   | Autoklavi SPA                           | Fedegari Autoklavi,<br>Albuzzano (Italien) |
| Autoklav klein  | Tuttnauer Tischaufoklav<br>2450EL       | Systec, Wettenburg                         |
| Becherzentrifuge  | BHG, ZK 630                             | Hermle, Gosheim                            |
| cleanbench  | Heraafe HS 12                           | Heraeus Instruments, Hanau                 |
| pH-Titrator   | pH Titrimo STAT 718                     | Metrohm, Filderstadt                       |
| KPG-Rührer  | IKA Laborrührer Eurostar<br>basic ST-B  | IKA® Werke GmbH & Co.<br>KG, Staufen       |
| Kühlkammer (-20 °C)                                     |   | Viessmann, Hof                             |
| Kühlkammer (4 °)  |   | Viessmann, Hof                             |
| LentiKat®-Printer                                       | LentiKat®-Printer                       | Genialab, Braunschweig                     |
| Magnetrührer  | IKA-combining Reo<br>IKA-RC basic       | IKA Labortechnik, Staufen                  |
| Mikrowelle  | R-202                                   | Sharp, Hamburg                             |
| Multirührplatte   | Variomag                                | H+P Labortechnik GmbH,<br>München          |
| pH-Meter  | WTW pH 526<br>WTW pH 525                | WTW, Weilheim                              |
| Photometer  | UV/VIS Spektralphotometer<br>SPECORD 40 | Jena Analytiker, Jena                      |
| Photometer (nur für Kapitel<br>3.3.3-3.3.6, OD-Messung) | PMA2A                                   | Zeiß, Oberkochen                           |
| Stereomikroskop   | Stereolupe Stemi SV 8                   | Zeiß, Oberkochen                           |
| Thermostat  | F25                                     | Julabo, Seelbach                           |
| Trockenschrank  | UE 700                                  | Memmert GmbH &<br>Co. KG, Schwalbach       |
| Vortex  | Agitateur Top-Mix 1118                  | Bioblock scientific                        |
| Waage   | Kern EW 3000-2M                         | Gottl. Kern & Sohn, Albstadt               |
| Waage   | Sartorius Universal                     | Sartorius, Göttingen                       |
| Zentrifuge für<br>Eppendorfgefäße                       | Centrifuge 5417 R                       | Eppendorf, Hamburg                         |
| Zentrifuge für<br>Falconröhrchen                        | Biofuge stratos                         | Heraeus Instruments, Hanau                 |

**8.2 Verwendete Chemikalien**

| <b>Chemikalie</b>   | <b>Hersteller</b>                               |
|---|---|
| β-NAD Hydrat, p.a.  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| β-NADH, Kaliumsalz, p.a.  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| AGEFLOC WT40, PDADMAC (Ausflockung)                               | CPS Chemical Company, Hamburg                   |
| AGEFLOC WT50, PDADMAC (Ausflockung)                               | CPS Chemical Company, Hamburg                   |
| Alginat, Protanal LF20/60   | FMC Biopolymer AS, Haugesund (Norwegen)         |
| Ammoniumformiat, p.a.   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Ampicillin, Natriumsalz p.a.                                      | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Bradford-Standard-Lösung, „Bradford-Reagenz B6916“                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Proteinstandards aus Rinderserumalbumin, fertige Lösungen 2 mg/ml | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Test-Kit EZ:faast   | Phenomenex (USA)                                |
| κ-Carrageenan, Gelcarin SA 911                                    | FMC Biopolymer AS, Haugesund (Norwegen)         |
| Cellulosesulfat (Ausflockung)                                     | CP Kelco Germany GmbH, Grossenbrode             |
| Cellulosesulfat (Verkapselung), 2,4 bzw 5 % in 0,63 % NaCl        | Biorefinery, Potsdam                            |
| Chitosan "fine grade"-Produkt, Batch-No. TM578                    | Primex Ingredients<br>ASA, Avaldsnes (Norwegen) |
| Chloramphenicol, p.a.   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Glycerin, 98 %  | Roth, Karlsruhe                                 |
| Glutardialdehyd 50 %, p.a.  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| LentiKat®-Liquid  | geniaLab GmbH, Braunschweig                     |
| L-Rhamnose Monohydrat, p.a.                                       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| L- <i>tert</i> -Leucin  | Degussa AG, Hanau                               |
| MOPSO Natriumsalz, p.a.   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| MOPSO Säure, p.a.   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Natriumformiat, p.a.  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| PDADMAC (Verkapselung) 4 % in 0,63 % NaCl                         | Biorefinery, Potsdam                            |
| PDADMAC sigma 522376 (Ausflockung)                                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München              |
| Polymin HM modifiziertes Polyethylenimin (Ausflockung)            | BASF, Ludwigshafen                              |
| Polymin PR8179, Polyvinylamin (Ausflockung)                       | BASF, Ludwigshafen                              |
| Polymin PR8182, Polyvinylamin (Ausflockung)                       | BASF, Ludwigshafen                              |

|  |   |
|--|---|
| Polymin SK, modifiziertes Polyethylenimin<br>(Ausflockung)                           | BASF, Ludwigshafen                                    |
| Schiffsches Reagenz, purpald®<br>SEC, 4824T342, Sulfoethylcellulose<br>(Ausflockung) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München<br>Wolff, Walsrode |
| Stabilizerlösung   | geniaLab GmbH, Braunschweig                           |
| Toluol   | Roth, Karlsruhe                                       |
| Trimethylpyruvat   | Degussa AG, Hanau                                     |
| TRIZMA®-base, p.a.   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                    |
| TRIZMA®-hydrochlorid, p.a.   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München                    |

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.



## 9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| Abbildung 1-1:  | Cofaktorregenerierung mit FDH und LeuDH zur Produktion von L-tert-Leucin                                       | 3  |
| Abbildung 2-1:  | HIV-Protease-Inhibitor der Firmen Sandoz (1), Abbott (2) und Bristol-Myers Squibb (3) (aus [12;76]).           | 8  |
| Abbildung 2-2:  | Prinzip der Cofaktorregenerierung  | 11 |
| Abbildung 2-3:  | Prinzip der elektrochemischen Cofaktorregenerierung  | 13 |
| Abbildung 2-4:  | 3 Möglichkeiten der elektrochemischen Cofaktorregenerierung am Beispiel der kathodischen Reduktion von NAD(P): | 13 |
| Abbildung 2-5:  | Substratgekoppelte Cofaktorregenerierung mit einer Alkoholdehydrogenase und Isopropanol als Substrat           | 16 |
| Abbildung 2-6:  | Cofaktorregenerierung mit FDH und LeuDH zur Produktion von L-tert-Leucin                                       | 20 |
| Abbildung 2-7:  | vereinfachte, schematische Darstellung der Methanoldissimilation in <i>Candida boidinii</i> [152]:             | 21 |
| Abbildung 2-8:  | dreidimensionale Kristallstruktur der FDH aus <i>Pseudomonas</i> sp. 101 [152]                                 | 22 |
| Abbildung 2-9:  | Reaktionsmechanismus der FDH aus <i>Candida boidinii</i> : Ordered Bi-Bi-Mechanismus                           | 23 |
| Abbildung 2-10: | Reaktion der Leucindehydrogenase   | 25 |
| Abbildung 2-11: | Möglicher Reaktionsmechanismus der LeuDH aus <i>B. cereus</i> : ordered Bi-Ter-Mechanismus [15]                | 26 |
| Abbildung 2-12: | Einteilung und Darstellung der unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden                                      | 28 |
| Abbildung 2-13: | Zweistufenmodell der Symplexbildung [25;136]   | 35 |
| Abbildung 2-14: | Schematische Darstellung von Leiter- und Röhrestruktur von Symplexen [25;106;126;136]                          | 35 |
| Abbildung 2-15: | Entstehung von Hohlkugeln aus Polyelektrolyten   | 36 |
| Abbildung 2-16: | Struktur von Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC)  | 39 |
| Abbildung 2-17: | Struktur von Natriumcellulosesulfat  | 40 |
| Abbildung 2-18: | Monomere des Alginates: $\beta$ -D-Mannuronat und $\alpha$ -L-Guluronat ( aus [99])                            | 44 |
| Abbildung 2-19: | unterschiedliche Blocktypen des Alginats (aus [99]):   | 45 |
| Abbildung 2-20: | ionotrope Gelbildung bei Alginat (aus [99])  | 46 |
| Abbildung 2-21: | Struktur von $\kappa$ -Carrageenan und $\iota$ -Carrageenan (aus [99])   | 48 |
| Abbildung 2-22: | Gelbildung bei Carrageenan (aus [99])  | 49 |
| Abbildung 3-1:  | Beispielmessung der Enzymaktivität von verkapselter Formiatdehydrogenase                                       | 55 |
| Abbildung 3-2:  | Beispielchromatogramm der HPLC-Messung für TMP   | 57 |
| Abbildung 3-3:  | Beispielchromatogramm der L-tert-Leucin Analytik   | 58 |
| Abbildung 3-4:  | Ablasapparatur zur Herstellung von verkapselten Enzymen und Zellen   | 59 |
| Abbildung 3-5:  | Foto und Skizze von LentiKats® [aus 178]   | 68 |
| Abbildung 3-6:  | Plasmidkarten der Plasmide pAM10.1 und pAM3.25   | 69 |
| Abbildung 3-7:  | Typische Umsatzkurven zur Bestimmung der Zellaktivität   | 74 |

|                 |  |     |
|-----------------|--|-----|
| Abbildung 4-1:  | Stabilität der FDH bei unterschiedlichen pH-Werten   | 78  |
| Abbildung 4-2:  | Stabilität der FDH bei 30 °C   | 79  |
| Abbildung 4-3:  | Stabilität der LeuDH bei unterschiedlichen pH-Werten   | 79  |
| Abbildung 4-4:  | direkte Coquervernetzung des Enzyms mit Chitosan und Glutardialdehyd<br>(vereinfacht dargestellt) (aus [19])   | 81  |
| Abbildung 4-5:  | Restaktivität der FDH in Abhängigkeit der zugegebenen Menge an<br>Glutardialdehyd  | 82  |
| Abbildung 4-6:  | Räumliche Darstellung des aktiven Zentrums der <i>Pseudomonas</i> sp. 101-FDH  | 83  |
| Abbildung 4-7:  | Coquervernetzung der FDH an mit Glutardialdehyd aktivierte Chitosanflocken   | 83  |
| Abbildung 4-8:  | A: Berechnung der Restaktivität:    B: Enzymbeladung des Immobilisates<br>C: Berechnung der Restaktivität nach Formel 4-1  | 85  |
| Abbildung 4-9:  | Vereinfachte Darstellung der Ausflockung der FDH   | 87  |
| Abbildung 4-10: | Ausflockung der FDH mit unterschiedlichen kationischen Flockungsmitteln und<br>Berechnung der Restaktivitäten im Überstand und im Flockulat  | 88  |
| Abbildung 4-11: | Stabilität des FDH-Flockulates in Wasser, Natriumformiat und<br>Kaliumphosphatpuffer   | 89  |
| Abbildung 4-12: | Langzeitaktivität der FDH in Cellulosesulfat   | 91  |
| Abbildung 4-13: | Restaktivität und Mehreinsatz der Polyelektrolythohlkugeln   | 92  |
| Abbildung 4-14: | Enzymverlust der Polyelektrolythohlkugeln in das umgebene Medium   | 93  |
| Abbildung 4-15: | Restaktivitäten der FDH in den intakten Kugeln, den Kugelhüllen und im<br>Kugellinneren, Versuch 1-4 entsprechend Tabelle 4-1  | 95  |
| Abbildung 4-16: | Mögliche Lage der FDH in den zerstörten Hohlkugeln   | 96  |
| Abbildung 4-17: | Abhängigkeit der Enzymaktivität der FDH (frei und immobilisiert) von<br>unterschiedlichen NAD-Konzentrationen  | 98  |
| Abbildung 4-18: | Berechnung des $K_m$ -Wertes und von $v_{max}$ für die freie FDH   | 99  |
| Abbildung 4-19: | Restaktivität und Mehrfacheinsatz der in Hohlkugeln eingeschlossenen LeuDH   | 101 |
| Abbildung 4-20: | Restaktivitäten der einzeln verkapselten Enzyme und der Parallelverkapselung   | 102 |
| Abbildung 4-21: | A) Reaktion mit einzeln verkapselten Enzymen (Diffusion des Cofaktors durch<br>die Kapselmembran nötig)    B) Reaktion mit parallelimmobilisierten<br>Enzymen (Cofaktor wird innerhalb der Kapsel regeneriert) | 103 |
| Abbildung 4-22: | Möglicher Einfluss des pH-Wertes während der Herstellung auf die<br>Enzymverteilung  | 105 |
| Abbildung 4-23: | A) Enzymverlust in das umgebene Medium bei Kugeln hergestellt bei pH- Wert<br>5,9 und pH-Wert 8,2    B) Kugelform der Kugeln hergestellt bei pH-Wert 5,9<br>und pH-Wert 8,2                                    | 107 |
| Abbildung 4-24: | A) Restaktivität der Kugeln während des 7fachen Einsatzes    B) Hohlkugeln<br>nach den Einsätzen, Größe der Kugeln   | 109 |
| Abbildung 4-25: | Enzymverlust in das umgebene Medium bei Kugeln hergestellt bei pH-Wert 5,9<br>und pH-Wert 8,2, Reproduktionsversuch  | 110 |
| Abbildung 5-1:  | Biomasseverlust bei in PVAL-Linsen eingeschlossenen Zellen   | 112 |

|                 |   |     |
|-----------------|---|-----|
| Abbildung 5-2:  | A) Aktivitätsvergleich freie und in Calciumalginat eingeschlossene Zellen B) Kugelform der Calciumalginatkugeln (jeweils 2 Chargen)   | 113 |
| Abbildung 5-3:  | A) Mehrfacheinsatz der Calciumalginatimmobilisate B) Kugelform vor und nach den Einsätzen   | 114 |
| Abbildung 5-4:  | Abhängigkeit der Zellaktivität von der Substratkonzentration  | 116 |
| Abbildung 5-5:  | A) Zellaktivität während eines Mehrfacheinsatzes von in 2%iges Carrageenan verkapselten Zellen B) Carrageenan-Kugeln jeweils vor und nach den Einsätzen                       | 120 |
| Abbildung 5-6:  | A) Zellaktivität während eines Mehrfacheinsatzes von in 3%iges Carrageenan verkapselten Zellen B) Carrageenan-Kugeln vor und nach den Einsätzen                               | 121 |
| Abbildung 5-7:  | A) Zellaktivität während eines Mehrfacheinsatzes von in 3%iges Carrageenan verkapselten Zellen mit 450 mM TMP und 0,2 mM NAD B) Carrageenan-Kugeln vor und nach den Einsätzen | 123 |
| Abbildung 5-8:  | TMP-Verbrauchskurven während einiger Einsätze (Einsatz 3, 5 und 10) innerhalb des Mehrfachfacheinsatzes   | 124 |
| Abbildung 5-9:  | Vergleich der Abhängigkeit der Aktivität von der NAD-Konzentration bei unterschiedlichen Einschlussmaterialien und TMP/Natriumformiat-Konzentrationen                         | 126 |
| Abbildung 5-10: | Prinzip der quantitativen Messung vom Gesamtgehalt an NAD und NADH im Probenüberstand   | 130 |
| Abbildung 5-11: | Extinktionskurve (340nm) einer NAD/NADH-Messung (hier aus der Kalibration)  | 131 |
| Abbildung 5-12: | Kalibrationsgerade zur Messung von NAD/NADH   | 131 |
| Abbildung 5-13: | Extinktionsmessung bei 340 nm einer NADH-Messung im Überstand einer Probe   | 132 |
| Abbildung 5-14: | Verlauf der TMP- und der NAD-Konzentration im Überstand während eines Einsatzes mit Nachdosieren von NAD  | 133 |
| Abbildung 5-15: | Verlauf der NADH-Konzentration mit der Zeit bei unterschiedlichen Reaktionsansätzen   | 136 |
| Abbildung 5-16: | Reaktion der DNA-Ligase und der NAD-Pyrophosphatase (aus [122])   | 137 |

## 9.2 Tabellenverzeichnis

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| Tabelle 2-1  | Häufig in der Natur vorkommende Coenzyme und prostetischen Gruppen (aus [123]) | 9  |
| Tabelle 2-2: | Coenzymkosten 2003 [169]   | 10 |
| Tabelle 2-3: | Einige zur Cofaktorregenerierung angewendete Enzyme                            | 17 |
| Tabelle 2-4: | Kinetische Daten der FDH aus <i>Candida boidinii</i>                           | 23 |
| Tabelle 2-5: | Kinetische Daten der LeuDH aus <i>Bacillus cereus</i>                          | 27 |
| Tabelle 2-6: | Unterschiedliche Anwendungen von Polyelektrolythohlkugeln                      | 38 |
| Tabelle 3-1: | Verkapselungsbedingungen der in Kapitel 5 hergestellten Polyelektrolytkapseln  | 60 |
| Tabelle 3-2: | verwendete Flockungsmittel zur Ausflockung der FDH                             | 63 |

|                     |   |            |
|---------------------|---|------------|
| <i>Tabelle 3-3:</i> | <i>Verkapselungsbedingungen der in Kapitel 6 hergestellten Alginat/Carrageenankugeln</i>                                  | <i>66</i>  |
| <i>Tabelle 3-4:</i> | <i>Bildung von L-tert-Leucin aus Trimethylpyruvat (Versuch freie Zellen, 700 mM Natriumformiat, 100 mM TMP, 4 mM NAD)</i> | <i>73</i>  |
| <i>Tabelle 3-5:</i> | <i>Standardbedingungen der Aktivitätsmessung von Alginat- und Carrageenankugeln</i>                                       | <i>74</i>  |
| <i>Tabelle 4-1:</i> | <i>Versuchsbedingungen zur Untersuchung der Lage der FDH in den Hohl-kugeln</i>   | <i>94</i>  |
| <i>Tabelle 4-2:</i> | <i>Herstellungsbedingungen der Hohlkugeln bei unterschiedlichen pH-Werten</i>   | <i>106</i> |
| <i>Tabelle 5-1:</i> | <i>Messbedingungen der Experimente zum Einfluss der Substratkonzentration</i>   | <i>115</i> |
| <i>Tabelle 5-2:</i> | <i>Kinetische Daten der FDH und der LeuD<sub>H</sub> aus [73]</i>   | <i>117</i> |
| <i>Tabelle 5-3:</i> | <i>Verwendete Substratkonzentrationen zur Messung ihres Einflusses auf die Zellaktivität</i>                              | <i>127</i> |
| <i>Tabelle 5-4:</i> | <i>Kombinationen der Substratkonzentrationen mit den höchsten Aktivitäten</i>   | <i>128</i> |
| <i>Tabelle 5-5:</i> | <i>Messbedingungen der NAD/NADH-Messung</i>   | <i>130</i> |
| <i>Tabelle 5-6:</i> | <i>Versuchsbedingungen zur Untersuchung der NAD/NADH-Inaktivierung</i>  | <i>135</i> |

---

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-D. Vorlop für die Überlassung des interessanten Themas und das mir dabei entgegengebrachte Vertrauen. Sein stetes Interesse an der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine vielen hilfreichen Anregungen haben wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. S. Lang danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Dr. H. Gröger möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die anregenden Diskussionen und die Bereitstellung des Substrates Trimethylpyruvat bedanken.

Frau Dr. Sirilux Chaijamrus, Herrn Henning Wesely, Frau Dipl.-Ing. (FH) Julia Dörrie, Herrn Dipl.-Ing. (FH) Heiko Schütte, Frau Anke Laschin und Frau Claudia Korneli danke ich sehr herzlich für ihre engagierte Mitarbeit.

Für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima danke ich den Kollegen und Kolleginnen des Institutes für Technologie des vTI (ehemals FAL) Braunschweig. Im Einzelnen bedanke ich mich bei Frau Dr. Agnes Mirescu, Frau Emine Capan, meinen Bürokollegen Frau Dr. Viola Alm, Frau Dr. Britta Hübner und Herrn Peter Jazombek sowie den Kollegen des Biobereiches Frau Dipl.-Ing. (FH) Susanne Hirschmann, Frau Dipl.-Biotechnol. Claudia Wilkens, Frau Dr. Tanja Hartwich, Frau Dr. Anja Kuenz, Herrn Biotechnol. Claus Decker und Frau Dr. Milada Schubert.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern für ihre große Unterstützung und Hilfe vor allem in der letzten Phase der Arbeit.

Meinem Mann Dr.-Ing. Holger Fersterra danke ich ebenfalls sehr für seine Unterstützung, sein Verständnis und seine Geduld.

## LEBENS LAUF

|                          |   |  |
|--------------------------|---|--|
| <b>PERSÖNLICHE DATEN</b> | 14.10.1972:   | in Kiel geboren<br>verheiratet, 2 Söhne (geboren am 13.07.2006 und am 07.09.2008)  |
| <b>BERUFSTÄTIGKEIT</b>   | 02/03-04/06:  | <b>wissenschaftliche Angestellte</b><br>vTI (Johann Heinrich von Thünen-Institut), ehemals<br>FAL (Forschungsanstalt für Landwirtschaft),<br>Braunschweig              |
|                          | 02/01-01/03:  | <b>Produkt Spezialistin</b> (Herstellung Immundiagnostika)<br>ABBOTT GmbH,<br>Wiesbaden  |
|                          | 11/97-09/99:  | <b>Studentische Hilfskraft mit Lehrauftrag</b><br>Fachgebiet Technische Biochemie,<br>Technische Universität Berlin  |
| <b>AUSBILDUNG</b>        | 02/03-02/09:  | <b>Promotion</b><br>Technische Universität Braunschweig<br>Abschluß: <b>Dr. rer.-nat.</b>  |
|                          | 10/93-01/01:  | <b>Studium Biotechnologie</b><br>Technischen Universität Berlin<br>Abschluß: <b>Dipl.-Ing. für Biotechnologie</b>  |
|                          | <b>Diplomarbeit:</b>  | Fermentation von Glukose zu 1,3-Propandiol<br>Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, ehemals GBF<br>(Gesellschaft für Biotechnologische Forschung)<br>Braunschweig |
|                          | <b>Studienarbeit:</b>   | Klonierung eines tetracyclinsensitiven Vektors<br>University College Galway (Irland)   |
|                          | 04.06.1992:   | Höltygymnasium, Wunstorf<br>Abschluß: <b>Abitur</b>  |
| <b>VERÖFFENTLICHUNG:</b> | M. Hartlep, W. Hussmann, N. Prayitno , I. Meynial-Salles and A.-P. Zeng<br>(2002) Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-<br>propanediol from glucose. <i>App. Microbial. Biotechnol.</i> <b>60</b> :60-66. |  |